



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN



Funktion des Lysintransporters LysP von *Escherichia coli* in Transport und Regulation

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

MARTINA RAUSCHMEIER

am 14. Mai 2014

Gutachter

1. Prof. Dr. Kirsten Jung
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, LMU München
2. Prof. Dr. Thorsten Mascher
Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, LMU München
3. Prof. Dr. Ute Vothknecht
Department Biologie I, Bereich Botanik, LMU München
4. Prof. Dr. Dirk Metzler
Department Biologie II, Bereich Evolutionsbiologie, LMU München
5. Prof. Dr. Angelika Böttger
Department Biologie II, Bereich Zell- und Entwicklungsbiologie, LMU München
6. Prof. Dr. Martin Parniske
Department Biologie I, Bereich Genetik, LMU München

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2014

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eidesstatt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen. Die vorliegende Dissertation liegt weder ganz, noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vor.

Fürstenfeldbruck, 14. Mai 2014

.....
Martina Rauschmeier

Für meine Eltern

We shall not cease from exploring
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.

Thomas S. Eliot, Little Gidding, Seite 486
zitiert nach: ders., *The Complete Poems and*
Plays 1909-1950, New York 1971

Publikation

Teile der Abbildungen, Tabellen und Textauszüge der vorliegenden Arbeit wurden im Vorfeld in veränderter Form publiziert:

Rauschmeier, M., V. Schüppel, L. Tetsch & K. Jung, (2014)

New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*.

J. Mol. Biol. **426**: 215-229.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	X
Nomenklatur	XII
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 Definition von Säurestress bei Enterobakterien.....	5
3.2 Die Säurestressanpassung von <i>E. coli</i>	6
3.3 Das Cad-System von <i>E. coli</i>	9
3.4 Das regulatorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP	14
3.5 Transport der basischen Aminosäure L-Lysin in <i>E. coli</i>	16
3.6 Fragestellungen der Arbeit	18
4 Material und Methoden	20
4.1 Verwendete Materialien und Chemikalien.....	20
4.2 Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> , Plasmide und Oligonukleotide	21
4.3 Kultivierungsverfahren	32
4.3.1 Medien.....	32
4.3.2 Bestimmung der CadC-vermittelten Signaltransduktion in vivo.....	33
4.3.3 Lysintransportassay mit intakten Zellen.....	34
4.3.4 In vivo Protein-Protein-Interaktionsstudie	34
4.3.5 Rolle der LysP-Menge bei der Lysin-Co-Sensorik	35
4.3.6 Überproduktion von Proteinen	36
4.3.7 Dauerkulturen.....	37
4.4 Molekularbiologische und genetische Methoden	37
4.4.1 Isolation von Plasmid- und genomischer DNA.....	37
4.4.2 Modifikation von DNA	37
4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
4.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	38
4.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	38
4.4.6 DNA-Sequenzanalyse	38
4.4.7 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation	39
4.4.8 Stammkonstruktion	40
4.4.9 Plasmidkonstruktion.....	41
4.4.9.1 Ungerichtete Mutagenese von <i>lysP</i>	41
4.4.9.2 Zielgerichtete Mutagenese von <i>lysP</i>	41
4.4.9.3 Zielgerichtete Mutagenese von <i>cadC</i>	42
4.4.9.4 Konstruktion von CadC- und LysP-Chimären für in vivo BACTH-Studien.....	42
4.4.9.5 Klonierung von <i>lysP</i> -Orthologen.....	44

4.5	Biochemische und analytische Methoden	44
4.5.1	Präparation von invertierten Membranvesikeln und Zytosol	44
4.5.1.1	Präparation von CadC-Membransvesikeln für die Reinigung von CadC	44
4.5.1.2	Präparation von LysP-Membransvesikeln für die Reinigung von LysP	45
4.5.1.3	Isolation von Zytosol für die Reinigung von eGFP	45
4.5.1.4	Separation von Membranen und Zytosol zur Kontrolle der Membraninsertion	45
4.5.2	Reinigung von Proteinen	46
4.5.2.1	Reinigung von His ₁₀ -CadC	46
4.5.2.2	Reinigung von LysP-His ₆	46
4.5.2.3	Reinigung von eGFP-His ₆	47
4.5.3	Rekonstitution von LysP und Co-Rekonstitution von CadC und LysP	48
4.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
4.5.5	SDS-PAGE	49
4.5.6	Western Blot-Analyse	49
4.5.7	Quantitative β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung	50
4.5.8	In vivo Studien zur Interaktion von Proteinen (BACTH)	50
4.5.9	In vivo Fluoreszenzmikroskopie	51
4.5.10	In vivo Transportmessungen	51
4.5.10.1	In vivo Transportassay	51
4.5.10.2	Kinetische Studien	51
4.5.10.3	Substratspezifität von LysP	52
4.5.10.4	Inhibitoranalyse	52
4.5.11	In vitro Transportmessungen	52
4.5.11.1	In vitro Transportassay mit LysP- und LysP/CadC-Proteoliposomen	52
4.5.11.2	Effekt von artifiziell generierten (Ionen-)Gradienten auf den Lysintransport	53
4.5.11.3	Effekt von variierenden $\Delta\Psi$ auf den Lysintransport	53
4.5.11.4	Effekt von variierenden pH-Werten auf den Lysintransport	54
4.5.11.5	Counterflow- und Antiportexperimente	54
4.5.11.6	Generierung von Proteoliposomen in 100 mM KPi, pH 5,8	54
4.5.11.7	Bestimmung des internen Proteoliposomenvolumens	55
4.5.11.8	Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$	55
4.6	Bioinformatische Methoden	56
5	Ergebnisse	57
5.1	Topologie von LysP aus <i>E. coli</i>	57
5.1.1	In silico Topologievorhersage von LysP	57
5.1.2	3D-Strukturvorhersage von LysP	59
5.2	In vivo Analyse der Protein-Protein-Interaktion zwischen CadC und LysP	61
5.2.1	CadC interagiert mit LysP	62
5.2.2	Stimulus-abhängige Interaktion zwischen CadC und LysP	64
5.2.3	Identifikation von Positionen/Domänen in CadC involviert in die Interaktion mit LysP	67

5.2.4	Stimulus-abhängige Homooligomerisierung von LysP	73
5.2.5	Homooligomerisierung von CadC	74
5.3	Identifikation von Positionen in LysP essentiell für die Lysin-abhängige Regulation von CadC	76
5.3.1	Ungerichtete Mutagenese von <i>lysP</i>	76
5.3.2	Zielgerichtete Mutagenese von <i>lysP</i>	78
5.3.3	Transportdefiziente LysP-Varianten	87
5.3.4	Funktionale Signifikanz der Aspartate 275 und 278 von LysP für die Interaktion mit CadC ..	88
5.3.5	Effekt der Überproduktion der LysP-Varianten auf die CadC-vermittelte <i>cadBA</i> Expression	91
5.4	Einfluss von LysP-Orthologen auf die <i>cadBA</i> Expression in <i>E. coli</i>	92
5.5	Identifikation von periplasmatischen Kontaktstellen in CadC involviert in die Interaktion mit LysP	96
5.6	Analyse der Rolle des zellulären LysP-Moleküllevels in der Lysin-Co-Sensorik	100
5.7	Funktionale Charakterisierung von LysP	102
5.7.1	LysP fungiert als L-Lysin-spezifischer hochaffiner Transporter	102
5.7.2	Eigenschaften von LysP in Proteoliposomen	105
5.7.2.1	Reinigung und (Co-)Rekonstitution von LysP und LysP/CadC	105
5.7.2.2	In vitro Charakterisierung von LysP	106
5.7.2.3	LysP: Lysin-Uniporter oder Lysin/H ⁺ -Symporter?	111
6	Diskussion	117
6.1	Biochemische Charakterisierung von LysP	117
6.2	Das regulatorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP	121
6.2.1	Die konstitutive physikalische CadC/LysP-Interaktion	121
6.2.2	Konformationelle Kopplung zwischen der Regulations- und Transportfunktion von LysP ..	124
6.2.3	Die periplasmatischen Interaktionsstellen zwischen Sensor und Co-Sensor	128
6.2.4	Modell für das regulatorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP	130
6.2.5	Vergleich des CadC/LysP-Paares mit dem DcuS/DctA-DcuB-System aus <i>E. coli</i> und dem BceS/BceB-Modul von <i>B. subtilis</i>	132
6.2.6	Das Konzept der Transzeptoren bei Eukaryoten	133
7	Ausblick	136
8	Literatur	139
	Anhang	154
	Danksagung	156

Abkürzungsverzeichnis

A _x	Absorption der Wellenlänge x nm
AAT-Familie	engl. amino acid transporter-Familie
Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APC	engl. amino acid/polyamine/choline (for organocation)
APCS	engl. amino acid/polyamine/choline (for organocation)-superfamily
AR	engl. acid resistance
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BACTH	engl. bacterial adenylate cyclase two-hybrid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CadC _{PD}	periplasmatische Domäne von CadC
CadC _{ZD}	zytoplasmatische Domäne von CadC
CAP	engl. catabolite activator protein
cat	Chloramphenicol Acetyltransferase
CCB	Coomassie Brilliant Blau
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
Ci	Curie
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
CRP	engl. cAMP receptor protein
C-terminal	carboxyterminal
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltosid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
ΔΨ	Membranpotential
ΔpH	pH-Gradient
Δμ _H ⁺	elektrochemisches Protonenpotential
Δμ _{Li} ⁺	elektrochemischer Lithiumgradient
Δμ _{Lys} ⁺	elektrochemischer Lysingradient
Δμ _{Na} ⁺	elektrochemischer Natriumgradient
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DNP	2,4-Dinitrophenol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-P	engl. elongation factor P
eM9	erweitertes M9-Minimalmedium
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
evtl.	eventuell
GABA	γ-Aminobuttersäure
His _x -Tag	C-terminaler Histidin-Tag der Länge x
_x His-Tag	N-terminaler Histidin-Tag der Länge x
HK	Hauptkultur
H-NS	Histon-ähnliches Nukleoid-strukturierendes Protein
IgG	Immunglobuline der Klasse G

IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
K _D	Dissoziations-/Bindungskonstante
K _M	Michaelis-Konstante
LAO-System	Lysin-Arginin-Ornithin-System
LB	engl. lysogeny broth
LDAO	N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid
Lrp	engl. leucine-responsive protein
max.	maximal
MBP	engl. maltose-binding protein
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MU	Miller Units
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
Ni ²⁺ -NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
npt	Neomycin Phosphotransferase
N-terminal	aminoterminal
OD _x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
oNPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
P _x	Promotor des Gens x
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	engl. protein data bank (http://www.pdb.org)
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
pK _s	Säurekonstante
PMF	engl. proton motive force
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Protein-Protein-Interaktion
rpm	engl. rotations per minute
S2	zweite Substratbindestelle im Transportermonomer
SDS	Natriumlaurylsulfat
SOC-Medium	engl. super optimal broth with catabolite repression-Medium
sog.	sogenannt
t	engl. time
T18	T18-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussis</i>
T25	T25-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussis</i>
Tab.	Tabelle
TC	engl. transporter classification database (http://www.tcdb.org/)
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TG-Puffer	Tris/HCl-Glycerol-Puffer
TM	transmembran
TPP ⁺	Tetraphenylphosphonium Kation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts ^R	Thiosin-Resistenz
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v/v	engl. volume/volume
VK	Vorkultur
vs.	versus
w/v	engl. weight/volume
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Nomenklatur

Genprodukte werden so nummeriert, dass das erste Methionin in der Aminosäuresequenz des Wildtyp-Proteins mit „1“ deklariert wird. N-terminal oder C-terminal fusionierte Affinitäts-Tags oder Linker-Sequenzen werden bei der Nummerierung nicht berücksichtigt.

Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt (z. B. β -Lysin), handelt es sich im Falle aller erwähnten Aminosäuren um L-Aminosäuren (z. B. L-Lysin).

Aminosäuren sind entweder im Einbuchstaben- (z. B. K) oder Dreibuchstaben- (z. B. Lys) Code angegeben. Spezifische Positionen in Proteinen werden als Zahlen hinter der korrespondierenden Aminosäure angeführt (z. B. K163 oder Lys163).

Verkürzung bzw. variable Architektur von Proteinen wird so gekennzeichnet, dass zuerst das entsprechende Gen/Protein angegeben wird, gefolgt von den Aminosäurepositionen, die die ausgewählten Proteinbereiche bilden (z. B. *cadC*107-512 oder CadC107-512).

Bei Aminosäuresubstitutionen wird die native Aminosäure im Einbuchstabencode zuerst vor der entsprechenden Aminosäureposition genannt. Nach der Position wird die substituierte Aminosäure aufgeführt (z. B. K163A).

Zur vereinfachten Nomenklatur im Zuge der BACTH-Studie sind die T18- und T25-Fragmente bei N-terminaler Fusion an das/die Protein/Chimäre vor dem/die entsprechenden Protein/Chimäre aufgeführt (z. B. T18-LysP). Sind T18 oder T25 am C-Terminus des/der Proteins/Chimäre fusioniert, so werden die Fragmente nach dem/der korrespondierenden Protein/Chimäre genannt (z. B. LysP-T25). In Analogie wird die C-terminale Fusionierung von MBP an die CadC-Chimären durch Nennung von MBP im Anschluss an die Domänenarchitektur der Chimäre verdeutlicht (z. B. T25-CadC159-178-MBP).

LysP-Proteoliposomen enthalten ausschließlich rekonstituiertes LysP, während LysP/CadC-Proteoliposomen co-rekonstituierte LysP- und CadC-Proteine beinhalten.

1 Zusammenfassung

In jüngster Zeit mehren sich die Belege, wonach bei Bakterien Transportproteine als Co-Sensoren von Signaltransduktions-Maschinerien fungieren. Diese einzigartige Kopplung zwischen Stofftransport und Signaltransduktion erlaubt der Bakterienzelle im Zuge der Transkriptionsregulation die raffinierte Integration von statischen Konzentrationsänderungen und Stoffwechselflüssen. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit fokussiert auf die molekulare Analyse des regulatorischen Wechselspiels zwischen der Lysinpermease LysP und dem Membran-integrierten pH-Sensor und Transkriptionsaktivator CadC von *Escherichia coli*. Beide Proteine sind Bestandteile des Cad-Systems, das die Lysin-abhängige Adaptation von *E. coli* an Säurestress vermittelt. In vivo Interaktionsstudien zeigten, dass CadC und LysP in der Abwesenheit beider Cad-Stimuli (Lysin und niedriger pH-Wert) stabile heterooligomere Komplexe bilden, die durch Lysin und niedrigen pH-Wert moduliert werden. Im Zuge von in vivo Interaktionstests mit CadC-Varianten mit unterschiedlicher Domänenarchitektur wurde die periplasmatische Domäne von CadC (CadC_{PD}) neben der TM-Helix (spezifisch Phe165) des Sensors als essentiell für die Interaktion mit LysP identifiziert. Zielgerichtete Mutagenese definierte Arg265 und Arg268 in CadC_{PD} sowie Asp275 und Asp278 in LysP als potentielle periplasmatische Kontaktstellen. Die systematische detaillierte Analyse von zahlreichen LysP-Varianten mit Einzel- und Mehrfach-Aminosäuresubstitutionen implizierte, dass das Lysinsignal von Co-Sensor (LysP) zu Sensor (CadC) über Lysin-abhängige konformationelle Änderungen des Transporters nach Substratbindung und/oder -translokation transduziert wird (konformationelle Kopplung). Die Integration aller Daten der in vivo Interaktions- und Mutagenesestudie postuliert ein Modell, wobei die Aktivität von CadC durch LysP über intramembrane und periplasmatische Kontakte in Abwesenheit beider Cad-Stimuli inhibiert wird. Nach Induktion transferieren Lysin-abhängige Konformationsänderungen von LysP das Lysinsignal via einer direkten konformationellen Kopplung zu CadC ohne die CadC/LysP-Interaktion komplett aufzulösen. Darüber hinaus resultiert die pH-abhängige Protonierung von periplasmatisch lokalisierten Aminosäuren in beiden Proteinen in der Aufhebung von additiven elektrostatischen Wechselwirkungen, die wiederum eine weitere Destabilisierung der Sensor/Co-Sensor-Interaktion bedingt. Nun ist CadC zugänglich für die Aktivierung durch niedrigen pH-Wert und kann die Expression der Zielgene *cadBA* induzieren.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit steht die funktionale Charakterisierung von LysP aus *E. coli*. In vivo und in vitro Analysen demonstrierten, dass LysP als hochaffine und L-Lysin-spezifische Permease fungiert ($K_{M(Lys)}$ -Wert = 2,5 μ M; V_{max} = 39,5 nmol*(min*mg

Protein)⁻¹). Als Triebkräfte für den LysP-vermittelten Lysintransport wurde in vitro $\Delta\Psi$ mit physiologischer Polarität (innen negativ) und ein nach innen gerichteter pH-Gradient (ΔpH) identifiziert. Detaillierte stöchiometrische/energetische Kalkulationen lassen auf zwei LysP-katalysierte Transportmodi schließen: (i) einen Lysin-Uniportmechanismus getrieben durch $\Delta\Psi$ und (ii) einen Lysin/ H^+ -Symportmechanismus in Gegenwart von ΔpH .

2 Summary

There is increasing evidence that transport proteins are used as co-sensors for the bacterial signal transduction machinery. The coordination of substrate transport and signal transduction represents a sophisticated way to integrate information on metabolite fluxes into transcriptional regulation. The first part of the thesis focusses on the analysis of the molecular mechanism of the regulatory interplay between the lysine-specific permease LysP and the membrane-integrated pH sensor and transcriptional activator CadC, which together induce lysine-dependent adaptation of *Escherichia coli* under acidic stress. In vivo interaction studies revealed that, in the absence of either stimulus (lysine and low pH), the two proteins form a stable heterooligomeric association, which is modulated by lysine and low pH. Via in vivo interaction assays using CadC variants with different domain architecture, besides its transmembrane helix (specifically Phe165), the periplasmic domain of CadC (CadC_{PD}) was found to be involved in the interaction with LysP. Site-directed mutagenesis pinpointed Arg265 and Arg268 in CadC_{PD} as well as Asp275 and Asp278 in LysP as potential periplasmic interaction sites. Moreover, a systematic analysis of several LysP variants with single- and multiple-site replacements indicated that the lysine signal is transduced from co-sensor (LysP) to sensor (CadC) via lysine-dependent conformational changes of LysP upon substrate binding and/or translocation (conformational coupling). The integration of all results of the in vivo interaction and mutagenesis study suggests a scenario in which CadC activity is inhibited by LysP via intramembrane and periplasmic contacts in absence of either stimulus. Upon induction, lysine-dependent conformational changes in LysP transduce the lysine signal via a direct conformational coupling to CadC without resolving the interaction completely. Moreover, concomitant pH-dependent protonation of periplasmic amino acids in both proteins dissolves their electrostatic connections resulting in further destabilization of the CadC/LysP interaction. Now, CadC is susceptible to low pH and is able to induce the expression of the target genes *cadBA*.

The second part of this thesis deals with the detailed biochemical characterization of the *lysP* gene product of *E. coli*. Functional analyses with intact cells and proteoliposomes demonstrated that LysP functions as a lysine-specific high-affinity permease ($K_{m(\text{lys})}$ -value = 2.5 μM ; V_{max} = 39.5 nmol* (min*mg protein)⁻¹). Using an in vitro approach, a membrane potential ($\Delta\Psi$) with physiological polarity (inside negative) and an inwardly directed H⁺-gradient (ΔpH) were found to cause accumulation of L-lysine in LysP-proteoliposomes. These observations and detailed stoichiometric/energetic calculations suggest that the LysP-

mediated lysine transport occurs via two modes: (i) lysine-uniport driven by $\Delta\Psi$ and (ii) lysine/ H^+ -symport in presence of ΔpH .

3 Einleitung

3.1 Definition von Säurestress bei Enterobakterien

Die Gram-negative Familie der *Enterobacteriaceae* inkludiert neben harmlosen Kommensalen zahlreiche Pathogene wie z. B. diverse Arten der Gattungen *Escherichia*, *Salmonella* oder *Shigella*. Mitglieder der *Enterobacteriaceae* werden trivialerweise als Enterobakterien (enteron, gr. Darm) bezeichnet, da etliche Spezies den Gastrointestinaltrakt von Säugetieren als Habitat oder Infektionsort besiedeln. Um dort überleben und persistieren zu können, müssen kommensale sowie pathogene Enterobakterien moderate oder extreme Stresssituationen verschiedenster Art bewältigen. Dabei sind sie besonders sowohl innerhalb, als auch außerhalb des Wirtes starken Schwankungen des umgebenden pH-Wertes ausgesetzt, u. a. dem extrem niedrigen pH-Wert (pH 1-2) des Magens oder der Phagosomen bzw. Phagolysosomen der Epithelzellen des Darmes während der Pathogenese oder während des Zersetzungsprozesses von organischen Material nach Verlassen des Wirtes (Slonczewski & Foster, 1996, Bearson *et al.*, 1997). Als Säurestress definiert man den biologischen Effekt der Kombination von niedrigem pH und dem Vorhandensein von schwachen (organischen) Säuren (Bearson *et al.*, 1997). Schwache Säuren sind u. a. flüchtige Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat, die im Zuge der bakteriellen Fermentation im Dünndarm gebildet werden. In der ungeladenen protonierten Form sind schwache Säuren in der Lage, die prokaryotische Zytoplasmamembran zu permeieren und durch intrazelluläre Dissoziation den zytoplasmatischen pH-Wert zu senken (Bearson *et al.*, 1997). Diese intrazelluläre Akkumulation von schwachen Säuren bedingt neben der Beeinträchtigung der strukturellen Integrität und Funktionalität von Makromolekülen einen Abbau der pH-Differenz (ΔpH) über der Zytoplasmamembran. ΔpH ist eine Komponente der protonenmotorischen Kraft (PMF, engl. proton motive force) und nimmt folglich eine zentrale Rolle in der zellulären Bioenergetik ein. Der Abbau von ΔpH resultiert in funktionellen Störungen von z. B. Transportprozessen, Zellmotilität oder der Generierung von ATP (Foster, 2004). Daher ist die Fähigkeit potentiell lethale Veränderungen des umgebenden pH-Wertes zu detektieren und darauf mit geeigneten Strategien zu reagieren ausschlaggebend für das Überleben von Enterobakterien.

3.2 Die Säurestressanpassung von *E. coli*

Das pH-Optimum für das Wachstum des neutrophilen Enterobakteriums *Escherichia coli* liegt im neutralen Bereich. Allerdings vermag *E. coli* ohne Beeinträchtigungen des bakteriellen Wachstums bei extrazellulären pH-Werten von ~5-7 den zytoplasmatischen pH-Wert im Bereich von ~7,5-7,7 aufrechtzuerhalten (Padan *et al.*, 2005, Wilks & Slonczewski, 2007). Im Gegensatz toleriert *E. coli* bei der Magenpassage sehr niedrige externe pH-Werte ~1-3 ohne in dieser Nische zu wachsen (Foster, 2004). *E. coli* hat aktive und passive Strategien entwickelt, um die Existenz während Exposition zu pH-Werten innerhalb oder außerhalb des Wachstumsbereiches zu gewährleisten [Abb. 1, (Krulwich *et al.*, 2011)].

Zum Erhalt der pH-Homöostase spielt die Impermeabilität der Zytoplasmamembran für Protonen eine bedeutende Rolle. Abnahme der Protonenpermeabilität durch strategische post-synthetische Modifikationen der Lipid-Doppelschicht durch Bildung von Cyclopropan-Fettsäuren ist ein Hauptfaktor der pH-Homöostase und Säureresistenz von *E. coli* (Cronan Jr, 2002). Die zytoplasmatische Pufferkapazität ist ein passiver Schutzmechanismus, basierend auf kleinen organischen Molekülen (z. B. Aminosäuren) und ionisierbaren Gruppen von Proteinen (Slonczewski *et al.*, 2009, Krulwich *et al.*, 2011). Des Weiteren tragen anorganische Polymere (z. B. Polyphosphate) und Polyamine zur Pufferwirkung des Zytoplasmas bei (Wortham *et al.*, 2007, Seufferheld *et al.*, 2008).

In Gegenwart von pH-Werten ~5-7 (moderater Säurestress), die das bakterielle Wachstum nicht beeinträchtigen, wird als Basis der pH-Homöostase in *E. coli* eine diverse Kollektion an Genen transkriptionell hochreguliert (Abb. 1A). So wird unter aeroben Bedingungen die Expression von NAD(P)H-abhängigen Substrat-Dehydrogenasen und von H⁺-ausschleusenden Komplexen der Atmungskette erhöht, während die Expression der F₁F₀-ATP-Synthase reduziert wird, um den (Wieder-)Eintritt von Protonen zu limitieren (Hayes *et al.*, 2006). Dabei wird die Balance des Membranpotentials u. a. durch K⁺-Importsysteme gewährleistet (Roe *et al.*, 2000, Buurman *et al.*, 2004). Des Weiteren weisen Aminosäure-Decarboxylase-Systeme und Hydrogenasen unter Anaerobiose eine Säure-induzierte Erhöhung der zugrundeliegenden Genexpression auf (Slonczewski *et al.*, 2009, Noguchi *et al.*, 2010). Hydrogenasen katalysieren die Konversion von Protonen zu flüchtigem Wasserstoffgas (H₂) (Hayes *et al.*, 2006). Degradative Aminosäure-Decarboxylasen generieren unter Verbrauch von Protonen alkalische Polyamine, die durch entsprechende Aminosäure/Polyamin-Antiporter aus der Zelle exkretiert werden. Während Polyamine neben der puffernden Wirkung den Einstrom von Membran-gängigen organischen Säuren durch

Blockade von Porinen in der äußeren Membran unterbinden (Samartzidou & Delcour, 1999), spielt das produzierte CO₂ einen noch unbekannten Part in der pH-Homöostase von *E. coli* (Sun *et al.*, 2005). *E. coli* verfügt über Decarboxylase-Systeme für die Aminosäuren Lysin [Cad-System, Abb. 2, (Meng & Bennett, 1992a, Meng & Bennett, 1992b)], Arginin [Adi-System, (Stim & Bennett, 1993)] Glutamat [Gad-System, (Hersh *et al.*, 1996, Castanie-Cornet *et al.*, 1999)] und Ornithin [Spe-System, (Kashiwagi *et al.*, 1992)]. Diese Systeme werden durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert und die entsprechenden Aminosäure-Decarboxylasen weisen hinsichtlich der enzymatischen Aktivität Unterschiede in den pH-Optima auf (Richard & Foster, 2004). Darauf basiert die Anpassung von *E. coli* über einen weiten pH-Bereich.

Um unter extremen und wachstumshemmenden Säurestress (pH-Werte ~1-3) die Existenz sicherzustellen besitzt *E. coli* eine umfassende Anzahl an Protektions-Systemen, die diesem Enterobakterium eine limitierte pH-Homöostase für mehrere Stunden ermöglichen (Abb. 1B). Diese herausragende Eigenschaft wird als Säureresistenz bezeichnet (AR, engl. acid resistance). Um die pH-Homöostase bei pH-Werten von ~1-3 zu gewährleisten, verfügt *E. coli* grundsätzlich über drei AR-Systeme [AR1-3, (Foster, 2004)].

AR1 ist in der Abwesenheit von Aminosäuren (Lin *et al.*, 1996) aktiv und basiert auf der inversen Funktion der F₁F₀-ATP-Synthase (Richard & Foster, 2003). In Gegenwart von niedrigen pH-Werten von ~2,5-3 katalysiert diese Protonenpumpe unter der Hydrolyse von ATP den Efflux von H⁺ aus dem Zytoplasma (Richard & Foster, 2004). AR1 wird in der stationären Wachstumsphase RpoS- (alternativer Sigmafaktor σ^S) und CRP- (engl. cAMP receptor protein) abhängig aktiviert (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). Daher wird AR1 auch als Glucose-reprimiertes oder oxidatives AR-System betitelt. Allerdings ist das Verständnis molekularer Details des AR1-Systems noch sehr lückenhaft.

Im Falle von AR2 und AR3 handelt es sich um Aminosäure-Decarboxylase/Antiporter-abhängige Resistenzsysteme, die durch die Anwesenheit von extrazellulärem Arginin (AR2) und Glutamat (AR3) induziert werden. Bei externem pH-Wert ~2,5 halten beide Überlebensstrategien den zytoplasmatischen pH-Wert konstant bei ~4 [AR2: pH 4,7, AR3: pH 4,2, (Richard & Foster, 2004)]. Der Antiport-Mechanismus, der mit beiden Decarboxylase-Systemen assoziiert ist, ist elektrogen, d. h. bei einer stark ausgeprägten transmembranen pH-Differenz besteht die Gefahr einer Hyperpolarisation der Zytoplasmamembran (Foster, 2004). Um Δ pH zu kompensieren und die drohende Hyperpolarisation zu vermeiden, bedient sich *E. coli* eines umgekehrten (innen positiven) Membranpotentials [$\Delta\Psi$, (Iyer *et al.*, 2002, Richard & Foster, 2004)]. Chlorid-Kanäle vom

CIC-Typ scheinen bei dieser Umkehrung von $\Delta\Psi$ und bei der Wiederherstellung des generellen innen negativen $\Delta\Psi$ ab einem externen pH-Wert von ~ 4 -5 eine Rolle zu spielen (Iyer *et al.*, 2002, Foster, 2004, Slonczewski *et al.*, 2009).

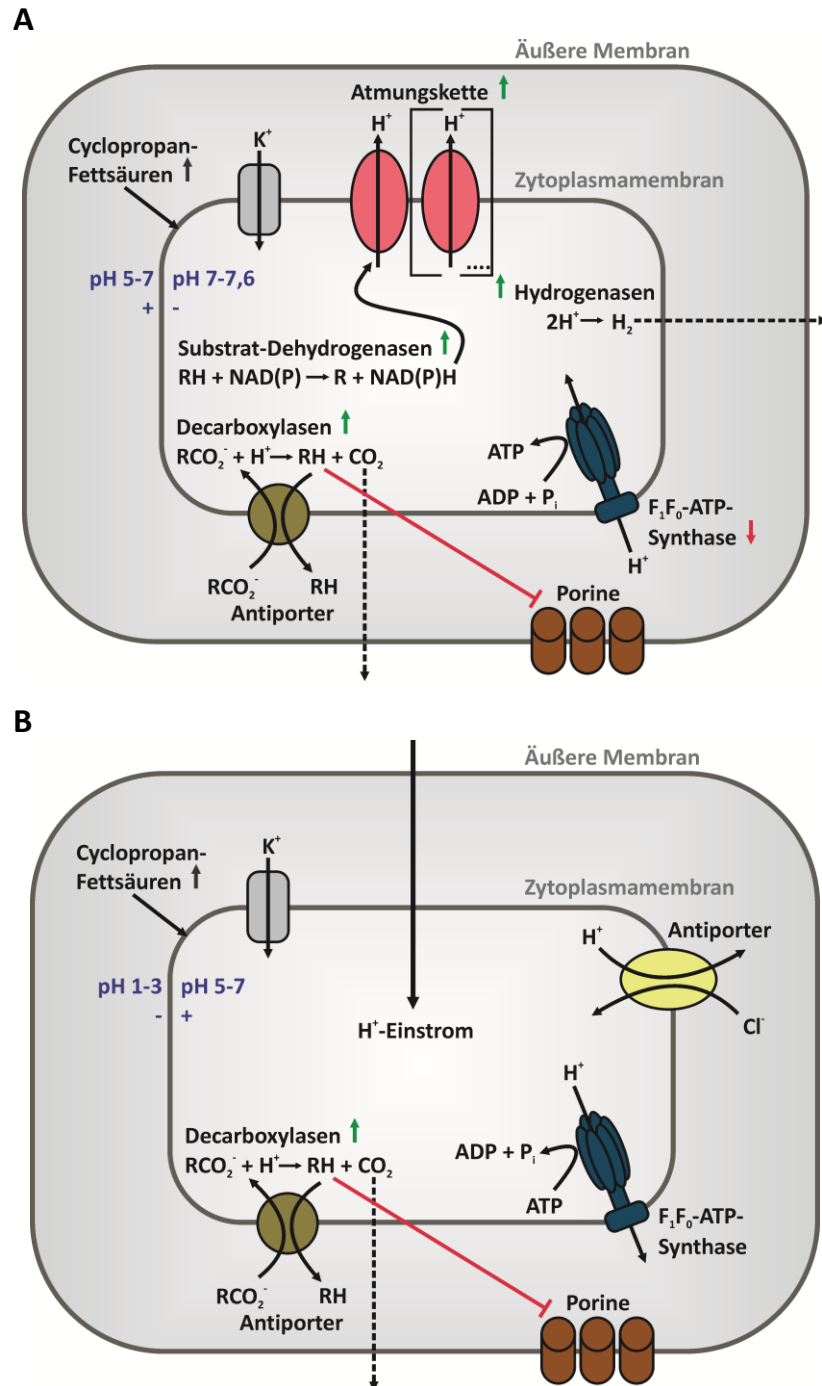


Abb. 1: Die Säurestressanpassung des fakultativ aeroben neutrophilen Enterobakteriums *E. coli* [nach Slonczewski *et al.* (2009) und Krulwich *et al.* (2011)]. A. Strategien der Säurestressanpassung bei externen pH-Werten von 5-7, die das bakterielle Wachstum nicht beeinträchtigen (nähere Details siehe Text). B. Säureresistenzmechanismen für die Sicherstellung des bakteriellen Überlebens bei extremen und wachstumshemmenden Säurestress (pH-Werte 1-3) (nähere Details siehe Text). + / -, Membranpotential $\Delta\Psi$; grüner Pfeil, transkriptionelle Aktivierung; roter Pfeil, transkriptionelle Reduktion; schwarzer Pfeil, Erhöhung.

Folglich erweitert *E. coli* für die Sicherstellung der Existenz bei extremen Säurestress Strategien (z. B. Aminosäure-Decarboxylase-Systeme), die für das Überleben und Wachstum bei moderatem Säurestress benötigt werden, mit der Inversion von $\Delta\Psi$, einem Mechanismus, der bei acidophilen Bakterien zu finden ist.

3.3 Das Cad-System von *E. coli*

Das Aminosäure-Decarboxylase-System für Lysin (Cad-System oder AR4-System) spielt eine untergeordnete Rolle bei der Protektion von *E. coli* in Gegenwart von extrazellulären pH-Werten von ~1-3 (Iyer *et al.*, 2003). Am effektivsten ist das Cad-Modul bei moderatem Säurestress (pH ~5-7). Die zentrale Komponente des Cad-Systems ist der Membranintegrierte pH-Sensor und Transkriptionsaktivator CadC, der die Expression des *cadBA* Operons reguliert, das die beiden Gene für den Lysin/Cadaverin-Antiporter CadB und die zytoplasmatische dekamere Lysin-Decarboxylase CadA umfasst [Abb. 2, (Sabo *et al.*, 1974, Watson *et al.*, 1992, Meng & Bennett, 1992a, Meng & Bennett, 1992b, Soksawatmaekhin *et al.*, 2004, Soksawatmaekhin *et al.*, 2006, Kanjee *et al.*, 2011)].

cadBA ist auf dem *E. coli* Chromosom bei 93,5 min lokalisiert und wird bicistronisch transkribiert (Auger *et al.*, 1989, Meng & Bennett, 1992a). Unmittelbar stromaufwärts von *cadBA* liegt *cadC*, dessen Expression konstitutiv ist (Watson *et al.*, 1992, Dell *et al.*, 1994). Allerdings wurde in neuesten Studien gezeigt, dass CadC durch EF-P (engl. elongation factor P) einer Regulation auf translationeller Ebene unterliegt (Ude *et al.*, 2013). EF-P verstärkt die Translation von Proteinen mit Polyprolin-haltigen Bereichen: In der Abwesenheit von EF-P stoppen die Ribosomen an diesen Polyprolin-Regionen, während diese translationelle Blockade in der Gegenwart von EF-P gemildert wird (Ude *et al.*, 2013). Bei *E. coli* Wildtyp beträgt die CadC-Kopiennummer ~3-5 Moleküle pro Zelle, die in einer EF-P-unabhängigen CadC-Variante (CadC-PPPIP/AAAIS) drastisch auf ~11-14 CadC-Moleküle pro Zelle gesteigert wird. Die entsprechende CadC-Variante ist charakterisiert durch einen Kontrollverlust der Regulation von *cadBA*, da diese Variante das Cad-Operon bereits in der Anwesenheit eines Stimulus (niedriger pH oder Lysin) induziert (Ude *et al.*, 2013). Folglich ist die durch EF-P regulierte Feineinstellung der Kopienzahl von CadC essentiell für eine adäquate Stressantwort.

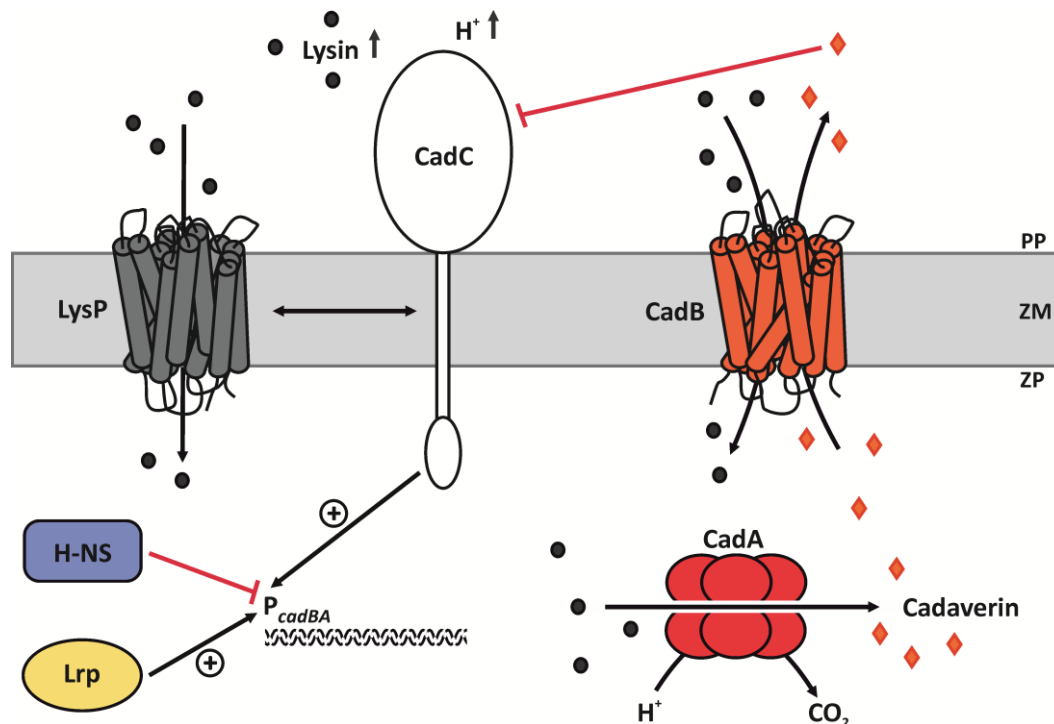


Abb. 2: Das Cad-System von *E. coli*. Unter induzierenden Bedingungen (Lysin ↑, H⁺ ↑) aktiviert der Membran-integrierte pH-Sensor und Transkriptionsregulator CadC die Expression der Zielgene *cadBA*. Das *cadBA* Operon kodiert für die zytosolische Lysin-Decarboxylase CadA und den Membran-integrierten Lysin/Cadaverin-Antiporter CadB. Während der niedrige pH-Wert direkt von der periplasmatischen Sensor-Domäne von CadC detektiert wird, erfolgt die Wahrnehmung des Lysinsignals indirekt durch ein Wechselspiel mit der Lysinpermease LysP. Eine Endprodukthemmung über Cadaverin führt zur Deaktivierung von CadC. H-NS fungiert als negativer Regulator der Transkription von *cadBA*, wohingegen Lrp aktivierend auf die *cadBA* Expression wirkt. Lysin ↑, hohe Lysinkonzentration; H⁺ ↑, hohe H⁺-Konzentration; PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

Moderater Säurestress, externes Lysin und geringer Sauerstoffpartialdruck resultieren in einer drastischen Erhöhung der CadA/B-Proteinlevel [CadA entspricht nach Induktion ~2% des zellulären Gesamtproteins, (Stim-Herndon *et al.*, 1996)]. Die Expression von *cadBA* unterliegt einer Feedback-Inhibition durch die Endprodukte der Lysin-Decarboxylierung, Cadaverin (Dell *et al.*, 1994, Neely *et al.*, 1994, Haneburger *et al.*, 2012) und CO₂ (Takayama *et al.*, 2006). Während kürzlich die mechanistischen Details der Cadaverinhemmung aufgeklärt werden konnten (Haneburger *et al.*, 2012), sind im Falle der CO₂-Inhibition die molekularen Grundlagen noch nicht bekannt (Takayama *et al.*, 2006). Die Sauerstoff-Abhängigkeit von *cadBA* wird vermutlich durch den globalen Transkriptionsregulator H-NS (Histon-ähnliches Nukleoid-strukturierendes Protein) vermittelt (Küper & Jung, 2005). H-NS fungiert in Enterobakterien als globaler Repressor, der neben dem Cad-System u. a. auch das Gad- und das Adi-System unter nicht-induzierenden Bedingungen reprimiert (Shi *et al.*, 1993,

Giangrossi *et al.*, 2005). Als zusätzlicher positiver Regulator der *cadBA* Expression wurde Lrp (engl. leucine-responsive protein) identifiziert (Ruiz *et al.*, 2011). Lrp scheint als physiologisches Barometer der Zelle die Expressionslevel des Cad-Operons unter Cad-aktivierenden Bedingungen an den physiologischen Status der Zelle anzupassen (Dillon & Dorman, 2010, Ruiz *et al.*, 2011).

Die Integration und Prozessierung der Signale niedriger pH-Wert, Lysin und Cadaverin wird auf bemerkenswerte Weise durch CadC vermittelt. CadC gehört zur Familie von ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivatoren, die zahlreiche Säurestress-regulierte Aktivatorproteine umfasst (Miller *et al.*, 1987). Namensgeber für diese Proteinfamilie ist ToxR, der Hauptregulator der Virulenz von *Vibrio cholerae* und anderen *Vibrio*-Spezies. ToxR-ähnliche Regulatoren sind durch einen konservierten modularen Aufbau gekennzeichnet. Die Verankerung in der Zytoplasmamembran erfolgt durch eine einzelne Transmembran (TM)-Domäne (CadC: AS (Aminosäuren) 159-178), die eine zytoplasmatische N-terminale Effektor-Domäne (CadC: AS1-158) von einer periplasmatischen C-terminalen Reizwahrnehmungsdomäne (CadC: AS179-512) separiert (K. Burdack, unveröffentlichte Daten). Da die Aktivierung von ToxR-ähnlichen Regulatoren ohne chemische Modifikation erfolgt (Miller *et al.*, 1987), stellen diese Proteine Ein-Komponenten-Systeme dar, die Sensor-, Signaltransduktions- und Effektorfunktion in einem Polypeptid vereinen (Ulrich *et al.*, 2005). Kürzlich wurde die drei-dimensionale Struktur der periplasmatischen Sensor-Domäne von *E. coli* CadC (CadC_{PD}) aufgeklärt [Auflösung: 1,8 Å, (Eichinger *et al.*, 2011)]. Ein charakteristisches Merkmal von CadC_{PD} ist der Aufbau aus einer N- und C-terminalen Subdomäne (Eichinger *et al.*, 2011). Eine weitere Besonderheit der CadC_{PD}-Kristallstruktur ist die Bildung von Dimeren (Eichinger *et al.*, 2011). Durch detaillierte Mutagenesestudien basierend auf der Struktur von CadC_{PD} konnte die Detektion des niedrigen pH-Wertes einer negativ geladenen, exponierten Region zugeordnet werden, die an der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren lokalisiert ist (Eichinger *et al.*, 2011, Haneburger *et al.*, 2011). Dabei wird die externe H⁺-Konzentration direkt durch titrierbare Seitengruppen einer konzertierten Gruppe saurer Aminosäuren sensiert (Haneburger *et al.*, 2011). Es wird postuliert, dass ein niedriger pH-Wert die Bildung von aktiven CadC-Dimeren durch H⁺-abhängige Ladungsneutralisation an der Dimer-Grenzfläche bedingt (Haneburger *et al.*, 2011).

Darüber hinaus fungiert CadC als direkter Sensor für den negativen Rückkoppler Cadaverin (Haneburger *et al.*, 2012). Es wurden zwei Cadaverin-Bindestellen unterschiedlicher Lage in CadC_{PD} identifiziert, wobei eine exponierte Bindestelle in der zentralen Kavität von CadC_{PD} lokalisiert ist, während die andere verdeckte höher affine Bindestelle an der Dimer-

Grenzfläche teils mit dem pH-sensorischen Bereich überlappt (Eichinger *et al.*, 2011, Haneburger *et al.*, 2012). Sequentielle Bindung von Cadaverin an beide Bindestellen resultiert durch Konformationsänderungen von CadC_{PD} in Deaktivierung des CadC-Dimers oder in Monomerisierung [kooperatives Kaskade-Modell der Cadaverin Feedback-Hemmung, (Haneburger *et al.*, 2012)].

Ein zusätzlicher funktionaler Bestandteil der pH-Aktivierung von CadC ist die Säure-abhängige Unterbindung der Bildung einer Disulfidbrücke in Subdomäne 1 von CadC_{PD} (Tetsch *et al.*, 2011). Im Kontrast zur direkten Sensierung von niedrigem pH-Wert und Cadaverin durch CadC wird das Lysinsignal durch ein Wechselspiel mit der Lysinpermease LysP wahrgenommen [(Tetsch *et al.*, 2008), siehe 3.4, Abb. 3].

Bei der Aktivierung von CadC scheint die Reihenfolge, in der die Cad-aktivierenden Signale (moderater Säurestress, Lysin) detektiert werden, keine Rolle zu spielen [nicht-sequentielles Modell der CadC-Aktivierung, (Neely & Olson, 1996)]. Über den Mechanismus, wie CadC die Signale von der periplasmatischen Input-Domäne über die Zytoplasmamembran zur zytoplasmatischen Effektor-Domäne transloziert, kann zum derzeitigen Stand der Forschung nur spekuliert werden. Bei der Signaltransduktion scheint eine unstrukturierte zytoplasmatische Linker-Region (AS107-158), die die DNA-Bindedomäne und die Transmembran-Domäne verbindet, von Bedeutung zu sein (S. Buchner, unveröffentlichte Daten). Als mögliche Mechanismen der Signaltransduktion werden u. a. reversible Monomer-Dimer-Übergänge von CadC oder reversible Konformationsänderungen wie Hub- oder Drehbewegungen des Transkriptionsaktivtors diskutiert (Haneburger *et al.*, 2011). Als Konsequenz der Signalwahrnehmung und -transduktion bindet die aktivierte N-terminale DNA-bindende-Domäne von CadC, ohne proteolytische Abspaltung vom Membran-integrierten Sensor (Fritz *et al.*, 2009), über ein *winged Helix-Turn-Helix*-Motiv direkt an die Bindestellen CAD1 und CAD2, stromaufwärtsgelegen vom Promotorbereich von *cadBA* (*P_{cadBA}*), und induziert die Expression des Cad-Operons (Küper & Jung, 2005). Derzeit wird folgende Hypothese favorisiert, nach der CadC durch räumliche Nähe zu *P_{cadBA}* ständig (d. h. Signal-unabhängig) an CAD1/CAD2 bindet und die Expression von *cadBA* über eine unter Cad-induzierenden Bedingungen hervorgerufene direkte aktivierende Protein-Protein-Interaktion (PPI) zwischen der α -Schleife des *Helix-Turn-Helix*-Motives der DNA-Bindedomäne von CadC mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase induziert (S. Buchner, unveröffentlichte Daten). Diese PPI ist transient, d. h. diese Interaktion wird unter Cad-inhibierenden Bedingungen aufgelöst - resultierend im Transkriptionsstop von *cadBA*. Eine derartige Stimulus-abhängige Interaktion mit der RNA-Polymerase wurde für den

Transkriptionsaktivator und Sensor von oxidativem Stress OxyR von *E. coli* experimentell bestätigt (Tao *et al.*, 1993, Tao *et al.*, 1995).

In physiologischer Hinsicht erfüllt das Cad-Modul von *E. coli* mehrere Funktionen. Die H⁺-konsumierende und Cadaverin-produzierende Decarboxylierung von Lysin gefolgt von der Exkretion des Polyamins bedingt eine Erhöhung des intra- und extrazellulären pH-Wertes und ermöglicht somit den Erhalt der zellulären pH-Homöostase und garantiert damit eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate von *E. coli* in Gegenwart von moderatem Säurestress (Watson *et al.*, 1992, Dell *et al.*, 1994, Neely *et al.*, 1994, Neely & Olson, 1996, Küper, 2005). Ein weiterer Beitrag zur pH-Homöostase ist die Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran z. B. für organische Säuren, die auf der Blockade der Porine OmpC und OmpF durch Cadaverin beruht (Samartzidou & Delcour, 1999, Samartzidou *et al.*, 2003). Des Weiteren bietet das Cad-System im Vergleich zu anderen Decarboxylase-Systemen von *E. coli* deutliche Überlebensvorteile gegenüber Membran-gängigen organischen Säuren unter Nährstoff-limitierenden Bedingungen [z. B. Phosphatmangel, (Moreau, 2007)]. Alle hier aufgelisteten Funktionen des Cad-Systems verdeutlichen die Rolle dieses Decarboxylase-Systems im Zuge der Anpassung an moderaten Säurestress. Als zusätzliche physiologische Funktion des Cad-Systems wird die Bereitstellung von CO₂ für die Biosynthese unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen diskutiert (Boeker & Snell, 1972, Futatsugi *et al.*, 1997, Takayama *et al.*, 2006). Dabei scheint die CO₂-produzierende Lysin-Decarboxykasereaktion den zellulären CO₂-Mangel (Resultat der Aktivitätshemmung des Citratzyklus) zu kompensieren.

Darüber hinaus steht die Funktion des Cad-Systems im Zusammenhang mit der Pathogenität von einigen Enterobakterien und *Vibrio*-Spezies. So vermittelt Cadaverin u. a. bei dem uropathogenen *E. coli* UPEC Resistenz gegenüber bei der Wirt-Immunantwort generierten Stickoxiden und Nitrosoverbindungen (Bower & Mulvey, 2006). Im gastrointestinalen Pathogen *Vibrio vulnificus* wird unter Superoxid-Stress die Expression von *cadBA* durch den Transkriptionsregulator SoxR unabhängig von CadC induziert (Kim *et al.*, 2006). Das Decarboxylierungs-Endprodukt Cadaverin scheint als Antioxidans für die Beseitigung der Superoxid-Radikale dem Pathogen *V. vulnificus* Schutz vor Superoxidstress zu gewährleisten (Kim *et al.*, 2006). Interessanterweise ist das Cad-System trotz der Bedeutung bei der Säurestressanpassung bei einigen enteroinvasiven *E. coli*- und dysenterischen *Shigella*-Spezies u. a. durch die Insertion von IS-Elementen in *cadC* auf Genomebene inaktiviert (Casalino *et al.*, 2003, Casalino *et al.*, 2005, Prosseda *et al.*, 2007). Für beide Spezies wäre ein intaktes Cad-System sehr ungünstig, da z. B. Cadaverin einen hemmenden Einfluss auf die für

den Besiedlungsprozess des Gewebes von *Shigella* notwendige Entzündungsreaktion ausübt (Sansonetti, 2001) und da für enteropathogene *cadC*-defiziente *E. coli* Stämme (EIEC) gezeigt wurde, dass Komplementation mit dem intakten *cad*-Lokus in einer verringerten Adhärenz der Bakterien an Zellen der Gewebekulturen resultierte (Jores *et al.*, 2006).

3.4 Das regulatorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP

Bereits 1980 wurde durch zwei unabhängige Studien der Genlokus bei 46,5 min auf dem Chromosom von *E. coli* mit der Regulation der induzierbaren Lysin-Decarboxylase CadA in Zusammenhang gebracht (Popkin & Maas, 1980, Tabor *et al.*, 1980). Mutation bzw. Deletion dieses Genlokus bedingte einen pleiotropen Phänotyp, charakterisiert durch Erhöhung der Proteinlevel von CadA in Abwesenheit von Lysin, Reduktion des Lysin-spezifischen Transportes und Resistenz gegenüber dem toxischen Lysinanalogon Thiosin [S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein, Ts^R, (Popkin & Maas, 1980, Tabor *et al.*, 1980)]. Daher wurde diesem Lokus die physiologische Funktion eines Regulators zugeordnet, der sowohl in die Kontrolle des Lysintransportes, als auch der Lysin-Decarboxylase involviert ist. Darauf basiert die Original-Bezeichnung dieses Genlokus *cadR* [Cad-Regulator, (Tabor *et al.*, 1980)]. Erst die detaillierte genetische und biochemische Analyse einer Transposonmutante, die ähnlich wie die *cadR*-Mutationen neben Ts^R auch Defekte im Lysin-spezifischen Transport aufwies, wurde der Lokus bei 46,5 min als Lysin-Permease (*lysP*) identifiziert (Steffes *et al.*, 1992). Das vorhergesagte Translationsprodukt von *lysP* ist ein Protein (LysP) bestehend aus 489 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 53,576 kDa (Steffes *et al.*, 1992). Computergestützte Hydrophobizitäts-Analysen und Topologie-Analysen mit *lacZ*- oder *blaM*-Genfusionen implizieren für LysP eine Verankerung in der Zytoplasmamembran mittels 12 Transmembrandomänen (Steffes *et al.*, 1992, Ellis *et al.*, 1995). Es wurde postuliert, dass LysP als Lysin-spezifischer Transporter fungiert [siehe 3.5, (Rosen, 1971)]. 1994 bestätigten Neely und Mitarbeiter experimentell LysP als negativen Regulator der *cadBA* Expression in Abwesenheit von externem Lysin, da Deletion von *lysP* in einer Lysin-unabhängigen Expression von *cadBA* resultierte (Neely *et al.*, 1994). Des Weiteren führte die Überproduktion von Plasmid-kodiertem LysP zu einer Repression der *cadBA* Expression selbst unter Cad-aktivierenden Bedingungen (Neely *et al.*, 1994). Basierend auf diesem Resultat und auf den neuesten Erkenntnissen von Ude *et al.* (siehe 3.3) beruht das Balance-Modell, gemäß dem die CadC/LysP-Ratio ausschlaggebend ist für eine adäquate Stress-abhängige Induktion von *cadBA* (Ude *et al.*, 2013). Bereits frühe *cadC*-Mutagenesestudien implizierten, dass beide Stimuli, niedriger pH-Wert und Lysin, zwar unabhängig voneinander

detektiert werden (niedriger pH: CadC, Lysin: LysP), aber ausschließlich durch CadC integriert und prozessiert werden (Dell *et al.*, 1994, Neely *et al.*, 1994). Neueste biochemische Experimente von Tetsch *et al.* zeigten, dass CadC eine sehr niedrige Affinität für Lysin aufweist ($K_D > 20$ mM) und vermutlich nicht als direkter Sensor für Lysin fungiert (Tetsch *et al.*, 2008). Stattdessen wird das Lysinsignal ausschließlich durch den Co-Sensor LysP sensiert und auf noch nicht geklärte Weise zu CadC transduziert. Dieses regulatorische Wechselspiel zwischen LysP und CadC basiert auf direkter Protein-Protein-Interaktion, die durch die TM-Domäne von CadC (besonders Phe165) vermittelt wird [Abb. 3, (Tetsch *et al.*, 2008)]. Es wurde ein Modell postuliert, nach dem in Abwesenheit von Lysin die Hemmung von CadC durch direkte PPI mit dem Co-Sensor LysP innerhalb der Zytoplasmamembran vermittelt wird (Tetsch *et al.*, 2008). Diese hemmende PPI wird unter Cad-aktivierenden Bedingungen aufgelöst, LysP fungiert als Lysin-Importer und CadC kann die Expression der Cad-Zielgene induzieren [Abb. 3, (Tetsch *et al.*, 2008)].

LysP vereint demnach zwei Funktionen in einem Polypeptid: Transport von Lysin und Regulation des Transkriptionsaktivators CadC. Basierend auf dieser Bifunktionalität zählt LysP zu den Trigger-Transportern (Tetsch & Jung, 2009a). Sowohl primäre, als auch sekundäre Transportsysteme sind als Trigger-Transporter an co-sensorischen Netzwerken beteiligt (Tetsch & Jung, 2009b). Die Regulationskopplung zwischen einem Trigger-Transporter und Komponenten der korrespondierenden Signaltransduktions-Kaskade erlaubt der Bakterienzelle neben der Detektion von statischen Konzentrationsänderungen auch die Integration von Fluxänderungen und Stoffwechselflüssen. Obwohl sich in jüngster Zeit die Belege mehren, wonach Transportproteine als Co-Sensoren fungieren und eine wichtige Rolle bei der Transduktion von Signalen über die Zytoplasmamembran spielen (Tetsch & Jung, 2009b), ist das Verständnis des zugrundeliegenden molekularen Wechselspiels noch sehr lückenhaft. Für alle Sensor/Co-Sensor-Paare wird eine direkte PPI postuliert, allerdings fehlt dafür in den meisten Fällen ein experimenteller Beleg. Auch die Kontaktstellen an der Grenzfläche der heterooligomeren Komplexe sind für die meisten Paare noch nicht detailliert charakterisiert. Darüber hinaus ist noch unklar, ob die Transportfunktion von Trigger-Transportern Voraussetzung ist für die akzessorische co-sensorische Funktion und ob Trigger-Transporter komplett die sensorische Funktion für das entsprechende Signal übernehmen oder nur eine Feinregulation des Sensors bewirken. Zu den am besten untersuchten Beispielen von co-sensorischen Netzwerken zählen die Sensor/Co-Sensor-Paare CadC/LysP (Tetsch *et al.*, 2008), MalT/MalK (Richet *et al.*, 2012), DcuS/DctA (Witan *et al.*, 2012a) von *E. coli* und BceS/BceB von *Bacillus subtilis* (Kallenberg *et al.*, 2013).

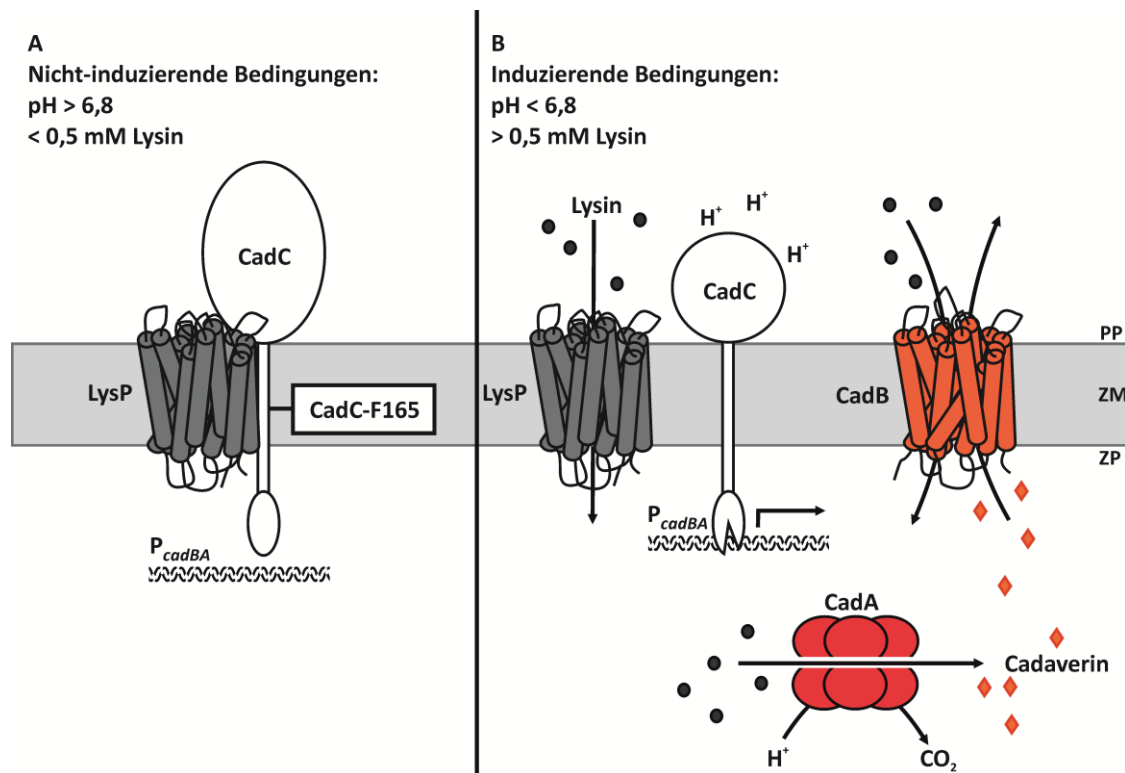


Abb. 3: Modell für die Lysin-abhängige Regulation von CadC vermittelt durch ein Wechselspiel mit der Lysinpermease LysP in *E. coli* (Lysin-Co-Sensorik, nach Tetsch *et al.*, 2008). A. In Abwesenheit von externem Lysin inhibiert die Lysinpermease LysP über eine direkte transmembrane PPI die Aktivität des pH-Sensors und Transkriptionsregulators CadC. B. In Gegenwart von Lysin kommt es zur Auflösung der CadC/LysP-Interaktion - CadC wird nun zugänglich für die Aktivierung durch niedrigen pH-Wert und induziert die Expression der Zielgene *cadBA*. CadA, Lysin-Decarboxylase; CadB, Lysin/Cadaverin-Antiporter; PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

3.5 Transport der basischen Aminosäure L-Lysin in *E. coli*

E. coli verfügt über drei distinkte Transportsysteme für die Aufnahme von L-Lysin, die sich hinsichtlich des Transportmechanismus, der Substratspezifität, der apparenten Michaelis-Konstanten (K_M) und der Regulation der Biosynthese unterscheiden.

argT-hisJQMP kodiert für das Lysin-Arginin-Ornithin- (LAO) System, das als ein generelles primäres Transportssystem für die Gruppe der basischen Aminosäuren fungiert (Rosen, 1971, Celis *et al.*, 1973). Dabei bildet HisQMP₂ den ABC-Transporter, während HisJ und ArgT als periplasmatische Bindeproteine die spezifische Bindung der Aminosäure Histidin (HisJ) und die Bindung der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin (ArgT) vermitteln (Nonet *et al.*, 1987, Chu *et al.*, 2013). ArgT weist für Arginin die höchste Affinität auf ($K_{D(\text{Arg})} = 1,5 \mu\text{M}$) und bindet Lysin ($K_{D(\text{Lys})} = 3,0 \mu\text{M}$) und Ornithin ($K_{D(\text{Orn})} = 5,0 \mu\text{M}$) mit geringerer Affinität (Rosen, 1971). *hisJQMP* zählt zum Arginin-Regulon von *E. coli* und steht

unter der Kontrolle des Arginin-Repressors ArgR (Caldara *et al.*, 2008). Im Gegensatz wird die Expression von *argT* unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen durch das Zwei-Komponentensystem NtrBC induziert (Zimmer *et al.*, 2000). Diese Kontrolle durch NtrBC impliziert für das ArgT/LAO-Modul eine Funktion als Anreicherungssystem für Stickstoffreiche Aminosäuren bei Stickstoffmangel. Das LAO-Transportmodul katalysiert die Aufnahme von Lysin mit einem K_M -Wert von 0,1-0,5 μM und einer maximalen Aufnahmerate (V_{\max}) von 1,5-1,8 $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ (Rosen, 1971, Celis *et al.*, 1973). In Gegenwart von niedrigem pH-Wert und extrazellulärem Überschuss von Lysin induziert der Transkriptionsaktivator CadC die Expression von *cadBA*. Unter diesen Bedingungen vermittelt der sekundäre Transporter CadB (Genprodukt von *cadB*) als Part des Cad-Systems die Exkretion von Cadaverin über einen elektrogenen Lysin/Cadaverin-Antiportmechanismus (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004, Soksawatmaekhin *et al.*, 2006). Somit spielt CadB in physiologischer Hinsicht eine wichtige Rolle bei der Säurestressanpassung von *E. coli* [siehe 3.2 und 3.3, (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004, Tomitori *et al.*, 2012)]. Im neutralen Milieu arbeitet CadB als Protonen-Symporter, der die Aufnahme von Cadaverin katalysiert (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004).

Ein weiteres Importsystem für Lysin ist spezifisch für diese Aminosäure und wurde daher als Lysin-spezifische Permease LysP betitelt (Steffes *et al.*, 1992). LysP gehört zur APC- [engl. amino acid/polyamine/choline (for organocation)] Superfamilie, spezifisch zur AAT- (engl. amino acid transporter) Familie von Transportern (Jack *et al.*, 2000). Im Zuge einer komparativen Analyse von Genen, Operons und regulatorischen Elementen, die in die Biosynthese von Lysin involviert sind, wurden orthologe LysP-Proteine sowohl in Gram-negativen Bakterien der Klasse γ -Proteobacteria (z. B. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*) sowie in zahlreichen Gram-positiven Bakterien der Familien *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae* und *Listeriaceae* identifiziert (Rodionov *et al.*, 2003). Die Gegenüberstellung der Genloki der identifizierten *lysP*-Orthologen zeigte, dass *lysP* in keinem Fall eine potentielle Operonstruktur mit anderen Genen z. B. der Lysinbiosynthese bildet, sondern ausschließlich als einfaches Gen vorliegt (Rodionov *et al.*, 2003). Die Aktivität von *E. coli* LysP ist durch das Lysinanalogon Thiosin hemmbar, unterliegt aber keiner Inhibition durch Arginin oder Ornithin (Rosen, 1971). Mittels früher Transportkinetischer Studien wurde für LysP ein $K_{M(\text{Lys})}$ -Wert von 5-10 μM und eine maximale Aufnahmerate von 2,5-2,8 $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ bestimmt (Rosen, 1971, Celis *et al.*, 1973). Allerdings steht die detaillierte und spezifische Untersuchung der energetischen Grundlage, der Triebkraft und der Transportcharakteristika des Lysintransportes durch

Plasmid-kodiertes LysP im Hintergrund einer Lysintransport-defizienten *E. coli* Mutante oder nach Reinigung und Rekonstitution von LysP in *E. coli* Phospholipide noch aus.

Neely und Olson zeigten, dass die Transkription von *lysP* durch die exogene Lysinkonzentration kontrolliert wird (Neely & Olson, 1996). Kürzlich identifizierten Ruiz und Mitarbeiter den LysR-Typ Transkriptionsaktivator ArgP als Hauptregulator der Expression von *lysP*, der vermutlich in Gegenwart von Lysinkonzentrationen $> 25 \mu\text{M}$ im Komplex mit dem Co-Effektor Lysin die Repression der Transkription von *lysP* vermittelt (Ruiz *et al.*, 2011). Bei Lysinmangel arbeitet ArgP im Komplex mit Arginin oder auch als unbeladenes Protein als Aktivator und induziert die *lysP* Expression (Ruiz *et al.*, 2011). Die Transkription von *lysP* wird darüber hinaus durch das globale Regulatorprotein Lrp, auch bezeichnet als physiologisches zelluläres Barometer, fein abgestimmt an den physiologischen Zustand der Bakterienzelle (Dillon & Dorman, 2010, Ruiz *et al.*, 2011). Im Hinblick auf die Regulation durch ArgP und Lrp scheint die hauptsächliche physiologische Funktion von LysP die Aufnahme von Lysin für biosynthetische Zwecke zu sein (Ruiz *et al.*, 2011). Außerdem nimmt LysP bei der zellulären pH-Homöostase von *E. coli* eine zentrale Stellung ein, da LysP als Trigger-Transporter neben der Transportfunktion auch über eine zusätzliche regulatorische Funktion verfügt und die Lysin-abhängige Aktivierung des Transkriptionsaktivators CadC vermittelt [siehe 3.4, Abb. 3, (Tetsch *et al.*, 2008)].

3.6 Fragestellungen der Arbeit

Die Kopplung von Signaltransduktion und Substrattransport ist bei Bakterien ein weit verbreiteter Mechanismus. Allerdings ist im Falle der meisten Sensor/Co-Sensor-Paare der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Co-Sensorik noch nicht bekannt. Obwohl das CadC/LysP-Paar von *E. coli* zu den am besten untersuchten Co-Sensorik-Systemen zählt, ist das Verständnis der regulatorischen Wechselwirkung zwischen beiden Membranproteinen noch sehr lückenhaft. Daher fokussiert der Hauptteil dieser Arbeit auf folgende Aspekte:

- a) In vivo Nachweis der direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen CadC und LysP.
- b) Identifikation des Interaktionspartners in LysP für CadC-Phe165 und Suche nach weiteren Positionen in LysP, die an der Vermittlung der PPI beteiligt sind.
- c) Screening von CadC nach Aminosäureresten, die neben der TM-Helix (Phe165) essentiell sind für die Interaktion mit LysP.
- d) Beantwortung der Fragen, wie das Lysinsignal vom Co-Sensor zum Sensor transduziert wird und ob die Transport- und Regulationsfunktion des Trigger-Transporters voneinander unabhängig bzw. gekoppelt sind.

- e) Analyse der Rolle der CadC/LysP-Moleküllevel und -ratio bei der Weiterleitung des Lysinsignals über die Zytoplasmamembran.

Für das Verständnis der dualen Funktion von LysP ist eine detaillierte funktionale Charakterisierung des Trigger-Transporters unabdingbar. Folglich konzentriert sich der zweite Part dieser Arbeit auf die in vivo und in vitro Analyse des Transportmodus und der Triebkräfte der durch LysP katalysierten Transportreaktion.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Tab. 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Materialien und Chemikalien.

Material/Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (ProtoGel-Fertiglösung)	National Diagnostics (Atlanta, USA)
Agarose	Serva (Heidelberg)
L-Alanin	Merck (Darmstadt)
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (NEB, Frankfurt)
Alkalische Phosphatase konjugiertes Anti-Maus-IgG	Rockland (Gilbertsville, USA)
Amidoblack 10 B	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	National Diagnostics (Atlanta)
Ampicillin Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Anti-Hase IgG	Rockland (Gilbertsville, USA)
Anti-GFP IgG	Roche Diagnostics (Mannheim)
L(+)-Arabinose	Roth (Karlsruhe)
L-Arginin-Monohydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
L-Asparagin-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
BioBeads	BioRad (München)
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt)
Brilliant Blau G250	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	AppliChem (Darmstadt)
Cadaverin Dihydrochlorid	Fluka (Neu-Ulm)
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (Frankfurt)
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
L-Citrullin	Sigma-Aldrich
L-Cystein	Sigma-Aldrich
Desoxyribonuklease I (DNase)	Sigma-Aldrich
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen (Karlsruhe)
L-2,4-Diaminobuttersäure Dihydrochlorid	Fluka (Neu-Ulm)
DL-2,3-Diaminopropionsäure Monohydrochlorid	Fluka (Neu-Ulm)
N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO)	Sigma-Aldrich
2,4-Dinitrophenol (DNP)	Merck (Darmstadt)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
DNA-Standard (2-Log DNA-Leiter)	New England Biolabs (Frankfurt)
DNA-Oligonukleotide	Sigma-Aldrich
DNeasy 96 Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Glycon (Luckenwalde)
EcoLume™ Liquid Scintillation Cocktail	MP Biomedicals
Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Serva (Heidelberg)
L-Glutaminsäure	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
L-Histidinhydrochlorid Monohydrat	Roth (Karlsruhe)
HiYield® Plasmid Mini-Kit	Süd-Laborbedarf (Gauting)
HiYield PCR® Clean-up & Gel-Extraction Kit	Süd-Laborbedarf (Gauting)
Hybond-P Protein Transfermembran	GE Healthcare (Braunschweig)
DL-5-Hydroxylysin Hydrochlorid	Fluka (Neu-Ulm)

Imidazol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	PeqLab (Erlangen)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)
Lipide (<i>E. coli</i> Polar Lipid Extract in CHCl ₃)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
β-Lysin	PepTech (Bedford, USA)
D-Lysin Monohydrochlorid	Fluka (Neu-Ulm)
L-Lysin Hydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
L-[¹⁴ C]Lysin	Hartmann Analytik (Braunschweig)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
L-Methionin	Roth (Karlsruhe)
Natriumdesoxycholat	Merck (Darmstadt)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Ni ²⁺ -NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT)	Biomol (Hamburg)
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare (Braunschweig)
Octyl-β-D-glucopyranosid	Calbiochem
L-Ornithin	Sigma-Aldrich
ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (oNPG)	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penta-His-Anti-Maus-IgG	Qiagen (Hilden)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Putrescin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich
Quick & Easy <i>E. coli</i> Gene Deletion Kit	Gene Bridges (Heidelberg)
Restriktionsenzym	New England Biolabs (Frankfurt)
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat	Sigma-Aldrich
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt)
Taq DNA-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
[³ H]Tetraphenylphosphonium bromide	American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint Louis, USA)
Thiosin (S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Roche-Diagnostics (Mannheim)
Tween 20	GE Healthcare (Braunschweig)
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Valinomycin	Sigma-Aldrich

Alle hier nicht aufgelisteten Materialien und Chemikalien wurden von den Herstellern Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess, Oldendorf), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) and Sigma-Aldrich-Corporation mit Reinheitsgrad „pro analysis“ bezogen.

4.2 Verwendete Stämme von *E. coli*, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2 aufgeführt, Plasmide in Tab. 3 und alle Oligonukleotide in Tab. 4.

Tab. 2: Stammliste.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> Stämme		
BL21(DE)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	(Studier & Moffatt, 1986)
BL21(DE)Δ <i>cadC</i>	BL21(DE) <i>cadC::cat</i> (Cm ^R)	Diese Arbeit
BL21(DE)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	(Moffatt & Studier, 1987)
BTH101	F ⁻ <i>cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1</i> (Str ^r) <i>hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	Euromedex, Straßburg
DH5α	F' <i>endA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) glnV44 thi-1 recA1 relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR(φ80-ΔlacZM15) gyrA(NalR)</i>	Promega, Mannheim
DH5αλpir	F' λ::pir <i>endA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) glnV44 thi-1 recA1 relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR(φ80-ΔlacZM15) gyrA(NalR)</i>	(Miller & Mekalanos, 1988)
EP314	F ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>) Δ(<i>lacIOPZYA</i>) <i>exa-1::MuDI1734 (KM lac) cadC1::Tn10</i> (Tet ^R , Kan ^R)	(Neely <i>et al.</i> , 1994)
EPCD4	EP314Δ <i>lysP</i> (Tet ^R , Kan ^R) (nach Entfernung der Cm ^R -Resistenzkassette aus EP314 <i>lysP::cat</i>)	Diese Arbeit
BW25113	Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ <i>phage</i> , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaDrhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW2307	BW25113 <i>argT::npt</i> (nach Entfernung der Kan ^R -Resistenzkassette: JW2307Δ <i>argT</i>)	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JWCD247	JW2307Δ <i>argT</i> Δ <i>cadB</i> Δ <i>lysP</i> (Kan ^R) Δ <i>cadB</i> : JW2307Δ <i>argT</i> x P1 (Δ <i>cadB</i>) Δ <i>lysP</i> : <i>lysP::cat</i> (Entfernung der Kan ^R - und Cm ^R -Resistenzkassetten)	Diese Arbeit
MG1655	<i>E. coli</i> K12-Referenzstamm	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
MG-CR	MG1655 Δ <i>lacZ::tet</i> <i>rpsL150</i> Δ <i>cadBA</i> <i>cadBA::lacZ</i>	(Ruiz <i>et al.</i> , 2011)
MG-MR1	MG1655 <i>lysP</i> :: <i>egfp</i> (translationale C-terminale Fusion von <i>egfp</i> an <i>lysP</i> , Kan ^R)	Diese Arbeit
MM39	<i>araD lacI</i> Δ <i>U1269 malE444</i> (Str ^R)	Jonathan Beckwith, persönliche Gabe
Weitere Bakterienstämme		
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM-319 (de Bary 1884)	DSMZ, Braunschweig
<i>Helicobacter pylori</i> P12	Isolat aus einem Patient mit Zwölffingerdarmkrebs, Deutschland 1992	(Fischer <i>et al.</i> , 2010)
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM-20030 (Schroeter 1872)	DSMZ, Braunschweig
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TT01	Wildtyp-Isolat, Trinidad und Tobago	(Fischer-Le Saux <i>et al.</i> , 1999)
<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	DSM-20501 (Schleifer und Fischer 1982)	DSMZ, Braunschweig

Tab. 3: Plasmidliste.

Plasmid	Genotyp/Konstruktion	Referenz
Allgemeine Plasmide		
pET16b	Expressionsvektor, Amp ^R	Novagen (Merck Millipore)
pET16b- <i>cadC2</i>	<i>cadC</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	(Küper & Jung, 2005)
pET16b- <i>cadC_F165A</i>	<i>cadC_F165A</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	(Tetsch <i>et al.</i> , 2008)
pET16b- <i>cadC_ΔF159-165</i>	<i>cadC_ΔF159-165</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	(Tetsch <i>et al.</i> , 2008)
pET16b- <i>cadC_putP_TM4</i>	Austausch der TM-Helix von CadC durch PutP-TM-Helix 4, <i>cadC_putP_TM4</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	(Tetsch <i>et al.</i> , 2008)
pET16b- <i>cadC_C208A, C272A</i>	<i>cadC_C208A, C272A</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	(Tetsch <i>et al.</i> , 2011)
pET16b- <i>cadC_ΔS188-R191</i>	<i>cadC_ΔS188-R191</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	L. Tetsch, unveröffentlicht
pET16b- <i>cadC6_176-RPQLV-177</i>	Insertion von RPQLV in TM-Helix von CadC zwischen AS176/177, <i>cadC6_176-RPQLV-177</i> in pET16b, 5'-His ₁₀ -Tag	S. Buchner, unveröffentlicht
pET21a	Expressionsvektor, Amp ^R	Novagen (Merck Millipore)
pET21a- <i>egfp</i>	<i>egfp</i> in pET21a, 5'-His ₆ -Tag	J. Lassak, unveröffentlicht
pBAD33	Expressionsvektor, Cm ^R	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD33- <i>lysP</i>	<i>lysP</i> in pBAD33, 3'-His ₆ -Tag	(Tetsch <i>et al.</i> , 2008)
pBAD24	Expressionsvektor, Amp ^R	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pT7-5	Expressionsvektor, Amp ^R	(Tabor & Richardson, 1985)
pT- <i>lysP</i>	<i>lysP</i> in pT7-5, 3'-His ₆ -Tag	(Tetsch <i>et al.</i> , 2008)
pT- <i>cadC1-215-malE</i>	<i>cadC1-215-malE</i> -Fusion in pT7-5	(Kraxenberger, 2006)
pNPTS138-R6KT	Suizidvektor (γ ori), für die Konstruktion von Inframe Deletionen über doppelt homologe Rekombination	(Lassak, 2010)
pNPTS138-R6KT- <i>egfp</i>	<i>egfp</i> in pNPTS138-R6KT	J. Lassak, unveröffentlicht
In vivo BACTH-Interaktionsstudie		
pUT18C	BACTH-Vektor, Amp ^R	Euromedex, Straßburg
pUT18	BACTH-Vektor, Amp ^R	Euromedex, Straßburg
pKT25	BACTH-Vektor, Kan ^R	Euromedex, Straßburg
pKNT25	BACTH-Vektor, Kan ^R	Euromedex, Straßburg
pKT25- <i>zip</i>	BACTH-Kontroll-Vektor	Euromedex, Straßburg
pUT18C- <i>zip</i>	BACTH-Kontroll-Vektor	Euromedex, Straßburg
pUT18C- <i>lysP</i>	<i>lysP</i> in pUT18C über XbaI/BamHI	S. Ude, unveröffentlicht
pUT18- <i>lysP</i>	<i>lysP</i> in pUT18 über XbaI/BamHI	S. Ude, unveröffentlicht
pKT25- <i>lysP</i>	<i>lysP</i> in pKT25 über XbaI/BamHI	S. Ude, unveröffentlicht

pKNT25- <i>lysP</i>	<i>lysP</i> in pKNT25 über XbaI/BamHI	S. Ude, unveröffentlicht
pUT18C- <i>cadC</i>	<i>cadC</i> in pUT18C über XbaI/BamHI	S. Ude, unveröffentlicht
pKT25- <i>cadC</i>	<i>cadC</i> in pKT25 über XbaI/BamHI	S. Ude, unveröffentlicht
pU18C- <i>yjiY</i>	<i>yjiY</i> in pUT18C über XbaI/BamHI	S. Behr, unveröffentlicht
pKT25- <i>yjiY</i>	<i>yjiY</i> in pKT25 über XbaI/BamHI	S. Behr, unveröffentlicht
pKT25- <i>yehU</i>	<i>yehU</i> in pKT25 über XbaI/BamHI	S. Behr, unveröffentlicht
pKT25- <i>cadC</i> _ΔF159-F165	PCR-Produkt <i>cadC</i> _ΔF159-165 (Template pET16b- <i>cadC</i> _ΔF159-165) in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> _F165A	PCR-Produkt <i>cadC</i> _F165A (Template pET16b- <i>cadC</i> _F165A) in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> _C208A_C272A	PCR-Produkt <i>cadC</i> _C208A_C272A (Template pET16b- <i>cadC</i> _C208A, C272A) in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> _176-RPQLV-177	PCR-Produkt <i>cadC</i> _176-RPQLV-177 (Template pET16b- <i>cadC</i> _176-RPQLV-177) in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> _ΔS188-R191	PCR-Produkt <i>cadC</i> _ΔS188-R191 (Template pET16b- <i>cadC</i> _ΔS188-R191) in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 159-178- <i>malE</i>	<i>cadC</i> 159-178- <i>malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 1-178- <i>malE</i>	<i>cadC</i> 1-178- <i>malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 1-192- <i>malE</i>	<i>cadC</i> 1-192- <i>malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 1-215- <i>malE</i>	<i>cadC</i> 1-215- <i>malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 107-512	PCR-Produkt <i>cadC</i> 107-512 in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 159-512	PCR-Produkt <i>cadC</i> 159-512 in pKT25 über XbaI/BamHI	Diese Arbeit
pKT25- <i>cadC</i> 1-159- <i>putPTM4-malE</i>	<i>cadC</i> 1-159- <i>putPTM4-malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pKT25- <i>putPTM10-cadC</i> 179-512	<i>putPTM10-cadC</i> 179-512-Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pUT18C- <i>lysP</i> -D275A_D278A	PCR-Produkt <i>lysP</i> -D275A_D278A (Template pBAD33- <i>lysP</i> -D275A_D278A) in pUT18C über XbaI/KpnI, 3'-His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pKT25- <i>lysPTM7</i> /Wt- <i>malE</i>	<i>lysPTM7</i> /Wt- <i>malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit
pKT25- <i>lysPTM7</i> /D275A_D278A- <i>malE</i>	<i>lysPTM7</i> /D275A_D278A- <i>malE</i> -Fusion in pKT25, Konstruktion siehe 4.4.9.4	Diese Arbeit

Zielgerichtete Substitution von Aminosäureresten in *LysP*, die mittels ungerichteter Mutagenese identifiziert wurden

pBAD33- <i>lysP</i> -S44F	<i>lysP</i> punktmutiert in S44 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -I147F	<i>lysP</i> punktmutiert in I147 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Weckerlein, 2010)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y157L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y157 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L.Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -R243N	<i>lysP</i> punktmutiert in R243 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Weckerlein, 2010)
pBAD33- <i>lysP</i> -A297T	<i>lysP</i> punktmutiert in A297 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -A311E	<i>lysP</i> punktmutiert in A311 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L.Tetsch, unveröffentlicht
pBAD33- <i>lysP</i> -G315R	<i>lysP</i> punktmutiert in G315 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -A348T	<i>lysP</i> punktmutiert in A348 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L.Tetsch, unveröffentlicht

pBAD33- <i>lysP</i> -W373R	<i>lysP</i> punktmutiert in W373 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -S392N	<i>lysP</i> punktmutiert in S392 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Weckerlein, 2010)
pBAD33- <i>lysP</i> -I407T	<i>lysP</i> punktmutiert in I407 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, unveröffentlicht
pBAD33- <i>lysP</i> -M481T	<i>lysP</i> punktmutiert in M481 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Weckerlein, 2010)
pBAD33- <i>lysP</i> -A318E	<i>lysP</i> punktmutiert in A318 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -A318D	<i>lysP</i> punktmutiert in A318 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -A318L	<i>lysP</i> punktmutiert in A318 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -A318V	<i>lysP</i> punktmutiert in A318 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
Zielgerichtete Substitution von aromatischen Aminosäuren in LysP		
pBAD33- <i>lysP</i> -F37L	<i>lysP</i> punktmutiert in R37 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y55L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y55 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y63L_F64L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y63 und F64 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -Y75L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y75 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F82L	<i>lysP</i> punktmutiert in F82 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y85L_Y89L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y85L und Y89L kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -F94L	<i>lysP</i> punktmutiert in F94 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F96L	<i>lysP</i> punktmutiert in F96 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W100L	<i>lysP</i> punktmutiert in W100 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y102L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y102 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -Y102F	<i>lysP</i> punktmutiert in Y102 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -W103L	<i>lysP</i> punktmutiert in W103 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y104L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y104 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -W106L	<i>lysP</i> punktmutiert in W106 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W106F	<i>lysP</i> punktmutiert in W106 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W123L_W124L_F125L	<i>lysP</i> punktmutiert in W123, W124 und F125 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W131L	<i>lysP</i> punktmutiert in W131 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W133L	<i>lysP</i> punktmutiert in W133 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F137L_F142L	<i>lysP</i> punktmutiert in F137 und F142 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y146L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y146 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)

pBAD33- <i>lysP</i> -F152L	<i>lysP</i> punktmutiert in F152 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y157L_W158L_F159L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y157, W158 und F159 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -F170L	<i>lysP</i> punktmutiert in F170 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F182L	<i>lysP</i> punktmutiert in F182 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -W190L_W193L_F200L	<i>lysP</i> punktmutiert in W190, W193 und F200 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F204L	<i>lysP</i> punktmutiert in F204 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F216L	<i>lysP</i> punktmutiert in F216 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F216Y	<i>lysP</i> punktmutiert in F216 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F218L	<i>lysP</i> punktmutiert in F218 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F246L_W247L	<i>lysP</i> punktmutiert in F246 und W247 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F252L	<i>lysP</i> punktmutiert in F252 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F255L	<i>lysP</i> punktmutiert in F255 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y253L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y253 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -Y266L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y266 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F284L	<i>lysP</i> punktmutiert in F284 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F288L	<i>lysP</i> punktmutiert in F288 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y317L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y317 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y324L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y324 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F336L	<i>lysP</i> punktmutiert in F336 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y350L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y350 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F360L_F365L	<i>lysP</i> punktmutiert in F360 und F365 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y371L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y371 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W373L	<i>lysP</i> punktmutiert in W373 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F383L_W386L	<i>lysP</i> punktmutiert in F383 und W386 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y394L_F396L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y394 und F396 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über BsrGI/SnaBI (1-Stufen-PCR)	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -Y400L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y400 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y412L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y412 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F416L	<i>lysP</i> punktmutiert in F416 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F417L	<i>lysP</i> punktmutiert in F417 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)

pBAD33- <i>lysP</i> -F423L_F425L	<i>lysP</i> punktmutiert in F423 und F425 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -Y437L_F440L_W447L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y437L, F440 und W447 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über BsrGI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -Y454L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y454 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -F460L	<i>lysP</i> punktmutiert in F460 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -W464L	<i>lysP</i> punktmutiert in W464 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über BsrGI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F465L	<i>lysP</i> punktmutiert in F465 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über BsrGI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -Y467L	<i>lysP</i> punktmutiert in Y467 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über BsrGI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -F475L_Y478L_F483L	<i>lysP</i> punktmutiert in F475, Y478 und F483 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über BsrGI/HindIII (1-Stufen-PCR)	Diese Arbeit
Zielgerichtete Substitution von positiv geladenen Aminosäuren in LysP		
pBAD33- <i>lysP</i> -R14L	<i>lysP</i> punktmutiert in R14 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R15L	<i>lysP</i> punktmutiert in R15 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R20L	<i>lysP</i> punktmutiert in R20 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -R150L	<i>lysP</i> punktmutiert in R150 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -K163A	<i>lysP</i> punktmutiert in K163 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -K163R	<i>lysP</i> punktmutiert in K163 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -K163L	<i>lysP</i> punktmutiert in K163 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -K236A	<i>lysP</i> punktmutiert in K236 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -R240L	<i>lysP</i> punktmutiert in R240 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -R248L	<i>lysP</i> punktmutiert in R248 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R273L	<i>lysP</i> punktmutiert in R273 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R321L	<i>lysP</i> punktmutiert in R321 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R334L_R341L	<i>lysP</i> punktmutiert in R334 und R341 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -R346L	<i>lysP</i> punktmutiert in R346 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R395L	<i>lysP</i> punktmutiert in R395 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -R397L	<i>lysP</i> punktmutiert in R397 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R398L	<i>lysP</i> punktmutiert in R398 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -R413L	<i>lysP</i> punktmutiert in R413 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)
pBAD33- <i>lysP</i> -R477L	<i>lysP</i> punktmutiert in R477 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	(Schüppel, 2011)

Zielgerichtete Substitution von negativ geladenen Aminosäuren in LysP

pBAD33- <i>lysP</i> -E16A	<i>lysP</i> punktmutiert in E16 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -E71A	<i>lysP</i> punktmutiert in E71 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -E91A	<i>lysP</i> punktmutiert in E91 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D113N	<i>lysP</i> punktmutiert in D113 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D127A	<i>lysP</i> punktmutiert in D127 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E154V	<i>lysP</i> punktmutiert in E154 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -E156V	<i>lysP</i> punktmutiert in E156 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -E197A	<i>lysP</i> punktmutiert in E197 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E222A	<i>lysP</i> punktmutiert in E222 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -E222D	<i>lysP</i> punktmutiert in E222 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E222L	<i>lysP</i> punktmutiert in E222 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E230V	<i>lysP</i> punktmutiert in E230 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, (Rauschmeier <i>et al.</i> , 2014)
pBAD33- <i>lysP</i> -E230D	<i>lysP</i> punktmutiert in E230 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E230L	<i>lysP</i> punktmutiert in E230 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E232Q	<i>lysP</i> punktmutiert in E232 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D233N	<i>lysP</i> punktmutiert in E233 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D268A	<i>lysP</i> punktmutiert in D268 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D275A_D278A	<i>lysP</i> punktmutiert in D275 und D278 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D275E_D278E	<i>lysP</i> punktmutiert in D275 und D278 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/SnaBI	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D275A	<i>lysP</i> punktmutiert in D275 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D278A	<i>lysP</i> punktmutiert in D278 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -E438A	<i>lysP</i> punktmutiert in E438 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D443A	<i>lysP</i> punktmutiert in D443 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit
pBAD33- <i>lysP</i> -D446A	<i>lysP</i> punktmutiert in D446 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i> über NcoI/HindIII	Diese Arbeit

Zielgerichtete Substitution von allen Cysteinen in LysP

pBAD33- <i>lysP</i> -C328A	<i>lysP</i> punktmutiert in C328 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, unveröffentlicht
pBAD33- <i>lysP</i> -C359A	<i>lysP</i> punktmutiert in C359 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, unveröffentlicht

pBAD33- <i>lysP</i> -C428A	<i>lysP</i> punktmutiert in C428 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pBAD33- <i>lysP</i>	L. Tetsch, unveröffentlicht
Zielgerichtete Substitution von spezifischen Aminosäureresten in CadC		
pET16b- <i>cadC2</i> _R265Q_R268Q	<i>cadC</i> punktmutiert in R265 und R268 kodierenden Triplets, PCR-Produkt in pET16b- <i>cadC2</i> über NcoI/BamHI	Diese Arbeit
pET16b- <i>cadC2</i> _N263K	<i>cadC</i> punktmutiert in N263 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pET16b- <i>cadC2</i> über NcoI/BamHI	Diese Arbeit
pET16b- <i>cadC2</i> _N263Q	<i>cadC</i> punktmutiert in N263 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pET16b- <i>cadC2</i> über NcoI/BamHI	Diese Arbeit
pET16b- <i>cadC2</i> _Q266P	<i>cadC</i> punktmutiert in Q266 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pET16b- <i>cadC2</i> über NcoI/BamHI	Diese Arbeit
pET16b- <i>cadC2</i> _Q266N	<i>cadC</i> punktmutiert in Q266 kodierendem Triplet, PCR-Produkt in pET16b- <i>cadC2</i> über NcoI/BamHI	Diese Arbeit
Klonierung von LysP-Orthologen		
pBAD33- <i>lysP</i> -bme	<i>lysP</i> -Ortholog aus <i>Bacillus megaterium</i> über NcoI/HindIII in pBAD33- <i>lysP</i> , 3'-His ₆ -Tag	(Wieland, 2013)
pBAD33- <i>lysP</i> -sca	<i>lysP</i> -Ortholog aus <i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> über NcoI/HindIII in pBAD33- <i>lysP</i> , 3'-His ₆ -Tag	(Wieland, 2013)
pBAD33- <i>lysP</i> -mlu	<i>lysP</i> -Ortholog aus <i>Micrococcus luteus</i> über NcoI/HindIII in pBAD33- <i>lysP</i> , 3'-His ₆ -Tag	(Wieland, 2013)
pBAD24- <i>lysP</i> -hpy	<i>lysP</i> -Ortholog aus <i>Helicobacter pylori</i> P12 über NcoI/XbaI in pBAD24, 3'-His ₆ -Tag	(Wieland, 2013)
pBAD33- <i>lysP</i> -hpy	<i>lysP</i> -Ortholog aus <i>Helicobacter pylori</i> P12 und Shine-Dalgarno-Sequenz aus pBAD24 über NheI/XbaI in pBAD33, 3'-His ₆ -Tag	(Wieland, 2013)
pBAD33- <i>lysP</i> -plu	<i>lysP</i> -Ortholog aus <i>Photorhabdus luminescens</i> über NcoI/HindIII in pBAD33- <i>lysP</i> , 3'-His ₆ -Tag	Diese Arbeit

Tab. 4: Primerliste. In dieser Tabelle sind alle Oligonukleotide aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit bei der Konstruktion von Plasmiden/Stämmen, Kontroll-PCR oder zur DNA-Sequenzierung verwendet wurden. Als Gegenprimer (benannt mit den Buchstaben A-G) werden die zweiten Oligonukleotide bezeichnet (erste Oligonukleotide = „Mismatch-Primer“), die im Zuge der korrespondierenden 1- bzw. 2-Stufen-PCR für die Generierung der gewünschten PCR-Produkte benötigt wurden.

Verwendung	Oligonukleotid	Oligonukleotidsequenz (5'-3')	Gegenprimer
Allgemeine Primer			
Kontroll-PCR von <i>E. coli</i> EPCD4	<i>lysP</i> -control up -for <i>lysP</i> -control down-rev	CTGTACAAGAACATGCTGGTGCGT ATCCAGAAAGCCGGAACAGCCTC	
Konstruktion und Sequenzierung von <i>LysP</i> -Varianten	pBAD24_sense Gegenprimer: A	TCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA	
Konstruktion und Sequenzierung von <i>LysP</i> -Varianten	pBAD24_anti Gegenprimer: B	ATATCGAAGGTCCCGGGTGCAACAACCTG	
Konstruktion und Sequenzierung von <i>LysP</i> -Varianten	pBAD33_for Gegenprimer: C	GACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCT CCATACCCGTTTTTTGGGCTAGCAGGAGG	
Konstruktion und Sequenzierung von <i>LysP</i> -Varianten	<i>LysP</i> _Mut_rev Gegenprimer: D	CGGCCCCAGTGGGAAGAAACCTGAACGGTA CGGCAGATCGTTAATGTCTGTG	
Konstruktion und Sequenzierung von <i>LysP</i> -Varianten	<i>LysP</i> -delTM-rev Gegenprimer: E	TGGGAAGAAACCTGAACGGTACGGCAGACT	
Konstruktion und Sequenzierung von <i>CadC</i> -Varianten	T7 Promoter Primer (Invitrogen) Gegenprimer: F	TAATACGACTCACTATAGGG	

Konstruktion und Sequenzierung von CadC-Varianten	T7 Terminator antisense (Invitrogen)	CCGTTTAGAGGCCCAAGG
<i>lysP</i> + 300 bp Promotorregion in pNPTS138-R6KT- <i>egfp</i>	Gegenprimer: G LysP-BamHI-eGFP-Tag-for LysP-PspOMI-eGFP-Tag-rev	AAAGGATCCTTGTGGCGTATAC TTTGGGCCCTTTCTTATCGTTC
Kontroll-PCR <i>E. coli</i> MG-MR1	LysP_R14L_for M13_rev	CGCCGGGCTTACTCCGTGAATTAAG AACAGCTATGACCATG
Sequenzierung aller pKT25-Konstrukte	Seq_pKT25_s Seq_pKT25_as	AATGCCGCCGGTATTCCACTG CTGACGGGGTGGTGCCTAACG
Sequenzierung aller pUT18C-Konstrukte	pUT18C_seq_s pUT18C_seq_as	CGTTCGAAGTTCTCGCCGGAT GGGGCTGGCTTAACATATGCGG

In vivo BACTH-Interaktionsstudie

• pKT25-cadC_ΔF159-165	CadC_2hybrid_sense	TTTCTAGAAATGCAACAACCTGTAGTTCGCGT
• pKT25-cadC_F165A		T
• pKT25-cadC_C208A_C272A	C_CadC_2hybrid_antisense	TTGGATCCTTATTCTGAAGCAAGAAATTTGTC
• pKT25-cadC_176-RPQLV-177		GAG
• pKT25-cadC_ΔS188-R191		
pKT25-cadC159-178-malE	CadC159-178-BamHI-for CadC1-178-NheI-rev	CGATTCCGGATCCATTTTGGGTATG CGTGTATCAAGGCTAGCAAACGCTAC
pKT25-cadC1-178-malE	CadC1-192-BamHI-for	CATATCGAAGGTGGATCCAATGCAACAACCT
		G
pKT25-cadC1-192-malE	CadC1-178-NheI-rev CadC1-192-BamHI-for	CGTGTATCAAGGCTAGCAAACGCTAC CATATCGAAGGTGGATCCAATGCAACAACCT
		G
pKT25-cadC1-215-malE	CadC1-192-NheI-rev pT7-5CadC_BamHI_for	CCGCGGATTGAGGCTAGCACGCGATTTGCTC GTAATAAGGAAAGGATCCAATGCAACAACCT
		G
pKT25-cadC107-512	pT7-5MalE_EcoRI_rev	CTTATCATCGATGAATTTCTTACTTGGTGATAC
		G
pKT25-cadC159-512	CadC107-512-XbaI-for C_CadC_2hybrid_antisense	GGTTATCTCTAGAAAGCGAAG TTGGATCCTTATTCTGAAGCAAGAAATTTGTC
		GAG
pKT25-cadC159-512	CadC159-512-XbaI-for C_CadC_2hybrid_antisense	CGATTCTCTAGAATTTTGGGTATG TTGGATCCTTATTCTGAAGCAAGAAATTTGTC
		GAG
pKT25-cadC1-159-putPTM4-malE	CadC1-192-BamHI-for	CATATCGAAGGTGGATCCAATGCAACAACCT
		G
	CadC-PutP-TM4-NheI-rev	CAAAATACGCGAGCTAGCACGCGCGCTGC
pKT25-putPTM10-cadC179-512	PutP_H10_XbaI_for PutP_H10_KpnI_rev	ACCGAAGATTTGTCTAGAAGCGTTTCTGCGT AAAGCCTGCCCACGGGTACCTCACTAAGCCC
		AG
pUT18C- <i>lysP</i> -D275A_D278A	CadC_KpnI_for_H1 CadC_EcoRI_rev	TACACGTCTTGGTACCAAAGCAAATCGC ATCAACCCGGGAATTTCTTATTCTGAAG
• pKT25- <i>lysPTM7</i> /Wt-malE	LysP-XbaI-BACTH-for LysP-KpnI-BACTH-rev	GCAGGAGGAATCTAGAAATGGCTGTTTCCG GCCAAAACAGGGTACCTTAGTGGTGGTGG
• pKT25- <i>lysPTM7</i> /D275A_D278A-malE	LysP-H7_Ins-BamHI-for LysP-H7_Ins-NheI-rev	ATCGGTATTGGATCCAGCGGAGT CGCCGCCGCGCTAGCCAGACCCG

Zielgerichtete Substitution von Aminosäureresten in LysP, die mittels ungerichteter Mutagenese identifiziert wurden (PCR-Template: pBAD33-*lysP*)

pBAD33- <i>lysP</i> -S44F	LysP_S44F_for LysP_S44F_rev	GCAACGATTTTTCAGGCAGGTC GACCTGCCTGAAAAATCGTTGC	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -A297T	LysP_A297T_for LysP_A297T_rev	CTGCTCTCTGCGACGGCGGTGATG CATCACCGCCGTCGCAGAGAGCAG	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -G315R	LysP_G315R_for LysP_G315R_rev	GGTAACTCCCGTATGTATGCG CGCATACATACGGGAGTTACC	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -W373R	LysP_W373R_for LysP_W373R_rev	ACGGTATACCTGCGGCTGCTGAACACC GGTGTTCAGCAGCCGCAGGTATACCGT	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -A318E	LysP_A318E_for LysP_A318E_rev	CTCCGGTATGTATGAGTCTACTCGTATG CATACGAGTAGACTCATACATACCGGAG	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -A318D	LysP_A318D_for LysP_A318D_rev	CCGGTATGTATGACTCTACTCGTATG CATACGAGTAGAGTCATACATACCGG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -A318L	LysP_A318L_for LysP_A318L_rev	GTATGTATTTGTCTACTCG CGAGTAGACAAATACATAC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -A318V	LysP_A318V_for LysP_A318V_rev	CCGGTATGTATGTGTTCTACTCGTATG CATACGAGTAGACATACATACCGG	C, D

Zielgerichtete Substitution von aromatischen Aminosäuren in LysP (PCR-Template: pBAD33-*lysP*)

pBAD33- <i>lysP</i> -Y63L_F64L	LysP_Y63L/F64L_for LysP_Y63L/F64L_rev	GGCCTGATGGTTTTGTTGCTGATGACCAAGTC GACTGGTCATCAGCAACAAAACCATCAGGCC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -Y75L	LysP_Y75L_for LysP_Y75L_rev	GAACCTGGCTGCATTGATGCCGTTTTCC GGAAACCGGCATCAATGCAGCCAGTTTC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -F94L	LysP_F94L_for LysP_F94L_rev	GTTGAAGAAGGCTTGGGCTTCGCGCTG CAGCGCGAAGCCCAAGCCTTCTTCAAC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -Y102L	LysP_Y102L_for LysP_Y102L_rev	GGCTGGAACCTATGGTACAACCTGGGCG CGCCAGTTGTACCATAAGTTCCAGCC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -Y102F	LysP_Y102F_for LysP_Y102F_rev	GCTGGAACCTCTGGTACAAC GTTGTACCAGAAGTTCCAGC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -F182L	LysP_F182L_for LysP_F182L_rev	GATTATCGGTATCTTGAAAGGCGCGCAG CTGCGCGCCTTTCAAGATACCGATAATC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -F246L_W247L	LysP_F246L/W247L_for LysP_F246L/W247L_rev	GTACGTCAGGTGTTGTTGCGAATCCTGTTG CAACAGGATTCGCAACAACACCTGACGTAC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -Y253L	LysP_Y253L_for LysP_Y253L_rev	CCTGTTGTTCTTAGTGTTTCGCGATCC GGATCGCGAACACATAAGAACAACAGG	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -Y350L	LysP_Y350L_for LysP_Y350L_rev	CGTAATGCGCTGTTGGCGACGACGGTG CACCGTCGTCGCCAACAGCGCATTACG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -W373L	LysP_W373L_for LysP_W373L_rev	ACGGTATACCTGTTGCTGCTGAACACC GGTGTTCAAGCAGCAACAGGTATACCGTC	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -Y394L_F396L	LysP_Y394L/F396L_rev	GTTAATGTCGTGTCCCTGCAATACGTAACCGC GACGCAAGCGCAAGTGGCTAATGGC	C
pBAD33- <i>lysP</i> -Y437L_F440L_W447L	LysP_Y437L/F440L/W447L_for LysP_Y437L/F440L/W447L_rev	CACCTTGGGCCAGAACTTGAAGCGTTGCTG AAAGATACTATTGACTTGGGCGGCGTAGCG CGCTACGCCGCCAAGTCAATAGTATCTTTCA GCAACGCTTCCAAGTTCTGGCCCAAAGTG	C, B
pBAD33- <i>lysP</i> -W464L	LysP_W464L_for LysP_W464L_rev	GATTATTTTGTTCGGCTAC GTAGCCGAACAAAATAATC	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -F465L	LysP_W465L_for LysP_W465L_rev	TTATTTGGTTGGGCTACAAGC GCTTGTAGCCCAACCAAATAA	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -Y467L	LysP_Y467L_for LysP_Y467L_rev	GGTTCCGGCTTGAAGCTG CAGCTTCAAGCCGAACC	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -F475L_Y478L_F483L	LysP_F475L/Y478L/F483L_rev	CATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTAGTGGTGG TGGTGGTGGTGTTCCTTATCGTTCTGCGGCAA CTTCATTTTCGCTCAAGCGTACCAAGTGAGTTC CTTTAATC	C

Zielgerichtete Substitution von positiv geladenen Aminosäuren in LysP (PCR-Template: pBAD33-*lysP*)

pBAD33- <i>lysP</i> -K163R	LysP_K163R_for LysP_K163R_rev	CTCACTGATCAGAGTCACGACAG CTGTCGTGACTCTGATCAGTGAG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -K163L	LysP_K163L_for LysP_K163L_rev	CACTGATCTTGGTCACGAC GTCTGACCAAGATCAGTG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -K236A	LysP_K236A_for LysP_K236A_rev	GATCCGCGCGCAAACATTTCCAC GTGGAATGTTTGGCCGCCGGATC	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -R240L	LysP_R240L_for LysP_R240L_rev	CGAAAAACATTCCACTCGCGGTACGTCAGG CCTGACGTACCGCGAGTGGAATGTTTTTCG	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -R395L	LysP_R395L_for LysP_R395L_rev	GCCACTATTTGTTCCGCTCG CGACGGAACAAATAGTGCG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -R398L	LysP_R398L_for LysP_R398L_rev	GCTTCCGTTTGGGTTACG CGTAACCCAAACGGAAGC	C, D

Zielgerichtete Substitution von negativ geladenen Aminosäuren in LysP (PCR-Template: pBAD33-*lysP*)

pBAD33- <i>lysP</i> -E91A	LysP_E91A_for LysP_E91A_rev	CTATGTTGCAGAAGGC GCCTTCTGCAACATAG	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -D113N	LysP_D113N_for LysP_D113N_rev	GGTGACTATCGCCGTTAACCTGGTTGCAGC GCTGCAACCAAGTTAACGGCGATAGTCACC	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -D127A	LysP_D127A_for LysP_D127A_rev	GTTCCCGGCTACACCGG CCGGTGTAAGCCGGGAAC	A, D
pBAD33- <i>lysP</i> -E197A	LysP_E197A_for LysP_E197A_rev	ATCGGCGCAGCGCCG CGGCGCTGCGCCGAT	B, C
pBAD33- <i>lysP</i> -E222D	LysP_E222D_for LysP_E222D_rev	CAGGGAACCGATCTGATCGG CCGATCAGATCGGTTCCCTG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -E222L	LysP_E222L_for LysP_E222L_rev	CAGGGAACCTTGCTGATCGG CCGATCAGCAAGGTTCCCTG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -E230D	LysP_E230D_for LysP_E230D_rev	CTGCAGGCGATTCCGAAGATC GATCTTCGGAATCGCCTGCAG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -E230L	LysP_E230L_for LysP_E230L_rev	CTGCAGGCTTGTCCGAAG CTTCGGACAAGCCTGCAG	C, D
pBAD33- <i>lysP</i> -E232Q	LysP_E232Q_for LysP_E232Q_rev	GCTGCAGGCGAGTCCCAGGATCCGGCGAAAA AC GTTTTTCGCCGGATCCTGGGACTCGCCTGCAG C	A, E
pBAD33- <i>lysP</i> -D233N	LysP_D233N_for LysP_D233N_rev	GCTGCAGGCGAGTCCGAAAAATCCGGCGAA TTCGCCGATTTCGGAAGTCCGCTGCAGC	A, E

Alle Kultivierungen von *E. coli* wurden bei 37°C durchgeführt, wenn nicht anders spezifisch vermerkt. Um das Zellwachstum zu kontrollieren, wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe des Ultrospec 2100 pro Photometers (Amersham Biosciences) bestimmt. Bei Bedarf wurden den Kulturen zur Selektion Antibiotika zugesetzt: 100 µg*mL⁻¹ (Ampicillin, Carbenicillin), 50 µg*mL⁻¹ (Kanamycin, Spectinomycin) und 34 µg*mL⁻¹ (Chloramphenicol). Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt.

Lysogeny broth- (LB) Medium [Komplexmedium, (Maniatis & Fritsch, 1982)]

KE-Minimalmedium (Epstein & Kim, 1971)

32

Zusätze:	Kohlenstoffquelle:	Effektor:
0,4 mM MgSO ₄	0,2% (w/v) Glucose oder	10 mM L-Lysin Monohydrochlorid
6 µM FeSO ₄	0,2% (w/v) Fructose	

Die Stammlösung, Zusätze, C-Quellen und der Effektor wurden jeweils getrennt angesetzt und autoklaviert bzw. steril filtriert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Stammlösung mit den Zusätzen angereichert und mit der entsprechenden C-Quelle und dem Effektor versetzt.

M9-Minimalmedium (Miller, 1992)

Stammlösung:	Zusätze:	Kohlenstoffquelle:
(5-fach konzentriert)	0,1 mM CaCl ₂	0,4% (w/v) Maltose
64 g*L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	2 mM MgSO ₄	
15 g*L ⁻¹ KH ₂ PO ₄		
2,5 g*L ⁻¹ NaCl		
5 g*L ⁻¹ NH ₄ Cl		
(pH 7,0)		

Die Stammlösung, Zusätze und C-Quelle wurden jeweils getrennt angesetzt und autoklaviert bzw. steril filtriert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Stammlösung mit den Zusätzen angereichert (erweitertes M9-Minimalmedium, eM9) und mit Maltose versetzt.

Super optimal broth with catabolite repression- (SOC)-Medium (Hanahan, 1983)

20 g*L ⁻¹ Trypton
5 g*L ⁻¹ Hefeextrakt
0,5 g*L ⁻¹ NaCl
0,95 g*L ⁻¹ MgCl ₂
0,186 g*L ⁻¹ KCl
3,96 g*L ⁻¹ Glucose
(pH 7,0)

4.3.2 Bestimmung der CadC-vermittelten Signaltransduktion in vivo

Für in vivo Bestimmungen der β -Galaktosidaseaktivität als Maß für die *cadBA* Expression wurden die Vorkulturen (VK) in 5 mL KE-Medium pH 7,6 plus 0,2% (w/v) Glucose aerob über Nacht im Roller inkubiert. Für die mikroaeroben Hauptkulturen (HK) wurden die Bakterien in KE-Medium pH 7,6 und pH 5,8, supplementiert mit und ohne 10 mM Lysin, auf eine optische Dichte von ~0,05 angeimpft und in maximal gefüllten 10 mL-Greiner-Röhrchen vorsichtig auf einer Wippe geschwenkt (2 rpm), um ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden. Nach Kultivierung bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 wurde 1 mL der Zellen in einem 2 mL Eppendorf-Röhrchen mittels Zentrifugation (10 min, 13.200 rpm, 4°C, Eppendorf 5415R) geerntet. Bis zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden die Zellpellets bei -20°C aufbewahrt.

Um den Effekt von erhöhten LysP-Mengen unter induzierenden Bedingungen (pH 5,8 plus 10 mM Lysin) auf die CadC-vermittelte *cadBA* Expression zu untersuchen, wurde bei den korrespondierenden HK 0,2% (w/v) Fructose als C-Quelle verwendet und die Expression von *lysP* während der kompletten Kultivierungsdauer mit 0,2% (w/v) Arabinose (da pBAD33-basiert) induziert.

Für die Analyse der Abhängigkeit der *cadBA* Expression von der externen Lysinkonzentration wurde die HK von *E. coli* MG-CR in KE-Medium pH 5,8 plus 0,2% Glucose in Gegenwart von steigenden Lysinkonzentrationen (0-128 mM) kultiviert.

4.3.3 Lysintransportassay mit intakten Zellen

Für die Messung von aktivem Lysintransport wurden VK von *E. coli* JWCD247 nach Transformation mit Plasmiden, kodierend für die gewünschten LysP-Varianten, in LB-Medium aerob über Nacht im Roller inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden 70-fach mit 50 mL frischem LB-Medium verdünnt und aerob im Schikane-Erlenmeyerkolben auf dem Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₄₂₀ von 1,0 kultiviert (HK). Nach Ernte durch Zentrifugation (10 min, 10.000 rpm, 4°C, Eppendorf 5804R) wurden die Zellen mit 100 mM Tris/2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) -Puffer (pH 7,6, 5 mM MgCl₂) 1x gewaschen. Das Pellet wurde in so viel Volumen des gleichen Puffer resuspendiert (aufkonzentriert), so dass eine Gesamtproteinkonzentration von 0,35 mg*mL⁻¹ (entspricht einer OD₄₂₀ von ~5,0) eingestellt wurde. Die Zellen wurden unmittelbar für die in vivo Transportmessungen verwendet.

4.3.4 In vivo Protein-Protein-Interaktionsstudie

Für β -Galaktosidase Messungen wurde *E. coli* BTH101 mit Plasmiden, kodierend für die entsprechenden T18- und T25-Fusionsproteine, co-transformiert. Die VK wurden in 5 mL LB-Medium, versetzt mit 0,5 mM Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), aerob im Roller bei 30°C über Nacht inkubiert. Mit diesen Bakterienkulturen wurde die gleiche Medienkomposition (5 mL HK) auf eine OD₆₀₀ von ~0,05 inokuliert und unter Aerobiose im Roller bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 kultiviert. Dann wurde 1 mL der HK-Kultur in einem 2 mL Eppendorf-Röhrchen mittels Zentrifugation (10 min, 13.200 rpm, 4°C, Eppendorf 5415R) geerntet und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Um den Einfluss von externem Lysin und pH auf die CadC/LysP- und LysP/LysP-Interaktion zu testen, erfolgte die Kultivierung der Übernacht-VK von BTH101, co-transformiert mit pUT18C-*lysP*/pKT25-*cadC*, pUT18C-*lysP*/pKT25-*lysP* bzw. pUT18C-*zip*/pKT25-*zip*

(Kontrolle), aerob bei 30°C in 5 mL LB-Medium supplementiert mit 0,5 mM IPTG. Diese Bakterienkulturen wurden dann in KE-Medium pH 7,6 und pH 5,8 (plus 0,2% Glucose), supplementiert mit variierenden Lysinkonzentrationen (0-128 mM) und 0,5 mM IPTG, auf eine OD₆₀₀ von ~0,05 angeimpft und in maximal gefüllten 10 mL-Greiner-Röhrchen bei 30°C vorsichtig auf einer Wippe geschwenkt (2 rpm), um mikroaerobe Bedingungen zu garantieren und ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden. Nach Kultivierung bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 wurde 1 mL der Bakteriensuspension in einem 2 mL Eppendorf-Röhrchen mittels Zentrifugation (10 min, 13.200 rpm, 4°C, Eppendorf 5415R) geerntet und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Anhand von Komplementationsstudien mit dem *malE*-defizienten *E. coli* Stamm MM39 nach Transformation mit Plasmiden kodierend für die MBP (engl. maltose-binding protein)-Hybridproteine fusioniert an T25 wurde überprüft, ob die MBP-Hybridkonstrukte in adäquaten Mengen exprimiert und korrekt in die Zytoplasmamembran inseriert wurden. Dabei wurde das Wachstum der Bakterien auf eM9-Minimalmedium-Agarplatten mit 0,4% (w/v) Maltose als einzige C-Quelle überprüft.

4.3.5 Rolle der LysP-Menge bei der Lysin-Co-Sensorik

Für die fluoreszenzmikroskopische Verifizierung der Biosynthese und Insertion des LysP-eGFP-Fusionsproteins in die Zytoplasmamembran von *E. coli* MG-MR1 erfolgte die VK der Bakterien in 5 mL KE-Medium pH 7,6 plus 0,2% Glucose aerob über Nacht im Roller. Damit wurde die 5 mL HK mit derselben Komposition auf eine OD₆₀₀ von ~0,05 angeimpft und unter Aerobiose im Roller bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 inkubiert. Ein Aliquot dieser Bakteriensuspension wurde sofort auf einen Objektträger mit Agarpad aufgetropft und mikroskopisch analysiert.

Für die Quantifizierung der CadC- und LysP-Mengen unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen wurde eine 5 mL VK von MG-MR1 in KE-Medium pH 7,6 plus 0,2% Glucose aerob über Nacht im Roller kultiviert. Damit wurde eine 50 mL Tageskultur (KE-Medium pH 7,6 plus 0,2% Glucose) im Schikane-Erlenmeyerkolben 1%ig inokuliert und unter Schütteln (200 rpm) aerob inkubiert. Mit dieser Kultur wiederum wurden 2x1 L KE-Medium pH 7,6 versetzt mit 0,2% Glucose in großen 2 L-Schikane-Erlenmeyerkolben erneut 1%ig überimpft und über Nacht im Schüttler (200 rpm) unter Aerobiose bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Nach Aufteilung der 2 L-Kultur in vier 500 mL Portionen erfolgte die Ernte der Zellen via Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, 30°C, Sorvall® Evolution_{RC}). Die erhaltenen vier Pellets wurden dann in vier sterilen 500 mL Schottflaschen

in vier unterschiedlichen Minimalmediumkompositionen (plus 0,2% Glucose) resuspendiert: 1) pH 5,8 + 10 mM Lysin, 2) pH 5,8 ohne Lysin, 3) pH 7,6 + 10 mM Lysin und 4) pH 7,6 ohne Lysin. Durch einfaches Stehenlassen der Schottflaschen im 37°C-Brutraum wurden die Zellen 1 h mikroaerob inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4°C, Sorvall® Evolution_{RC}) und die generierten Zellpellets wurden nach Schockfrostung bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.3.6 Überproduktion von Proteinen

Alle VK für die im Folgenden aufgelisteten Überproduktions-HK wurden pauschal in LB-Medium in für die Inokulation der HK ausreichenden Volumina aerob über Nacht im Roller/Schüttler (200 rpm) kultiviert. Im Falle von HK 1)-3) wurden die Zellen vor der Ernte 1x mit niederionischen Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5 plus 10 mM MgCl₂) gewaschen und dann mittels Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4 °C, Sorvall® Evolution_{RC}) geerntet. Nach Schockfrostung erfolgte die Lagerung der Pellets bei -80°C. Bei HK 4)-5) wurden die Zellen via Zentrifugation (10 min, 4500 rpm, 4°C, Eppendorf 5804R) geerntet und nach Schockgefrierung bei -20°C oder -80°C verwahrt.

1) Für die Überproduktion von LysP für anschließende Reinigung und Rekonstitution wurde die HK (LB-Medium in 2 L-Schikane-Erlenmeyerkolben) mit Zellen von BL21(DE)pLysS-pT-*lysP* auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und aerob auf dem Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Genexpression mit 0,5 mM IPTG für 3 h.

2) Für die Überproduktion von CadC für anschließende Reinigung und Co-Rekonstitution wurde die HK (LB-Medium in 2 L-Schikane-Erlenmeyerkolben) mit Zellen von BL21(DE)pLysS-pET16b-*cadC2* auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und aerob auf dem Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Genexpression mit 0,5 mM IPTG für 3 h.

3) Für die Überproduktion von eGFP für anschließende Reinigung wurde die HK (LB-Medium in 2 L-Schikane-Erlenmeyerkolben) mit Zellen von BL21(DE)pLysS-pET21a-*egfp* auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und aerob auf dem Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Genexpression mit 0,5 mM IPTG für 3 h.

4) Für den Nachweis der Biosynthese und Membranintegration von allen T18-/T25-CadC-Varianten in BL21(DE)Δ*cadC* und der Chimäre T18-LysP-D275A_D278A in BL21(DE)pLysS wurden je 20 mL HK (LB-Medium in 50 mL-Falcons) 1%ig inokuliert und aerob im Schüttler (200 rpm) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~2 inkubiert. Anmerkung:

Sowohl die entsprechenden VK (Inkubation bei 30°C!), als auch die HK enthielten während der kompletten Kultivierungsdauer 0,5 mM IPTG als Induktor für die Genexpression.

5) Für die Kontrolle der Produktion und Membraninsertion von allen LysP-Varianten (pBAD33-basiert) in EPCD4 und allen CadC-Varianten (pET16b-basiert) in BL21(DE)pLysS wurden 20 mL LB-Medium in 50 mL-Falcons mit 200 µL VK angeimpft und aerob im Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Nun wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,2% Arabinose (pBAD33) oder 0,5 mM IPTG (pET16b) für 3 h induziert.

4.3.7 Dauerkulturen

Für die längerfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurde eine frische aerob inkubierte Übernacht-VK (LB-Medium) mit 17% (v/v) Glycerol versetzt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20°C oder -80°C.

4.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

4.4.1 Isolation von Plasmid- und genomischer DNA

Plasmidisolationen wurden durch Verwendung des „HiYield® Plasmid Mini-Kit“ (Süd Laborbedarf) unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers ausgeführt. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde in 30 µL ddH₂O aufgenommen und bei -20°C oder -80°C gelagert.

Chromosomale DNA wurde mit Hilfe des „DNeasy 96 Blood & Tissue Kit“ (Quiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert. Gereinigte DNA wurde in 200 µL ddH₂O verdünnt und bei -20°C verwahrt.

4.4.2 Modifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders vermerkt, gemäß des Werkes „Molecular cloning: A laboratory manual“ durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). In vitro Modifikationen von DNA-Molekülen, wie Restriktionen und Ligationen, erfolgten gemäß den Empfehlungen des jeweiligen Enzymherstellers. Um unerwünschte Religationen zu vermeiden, wurden die Enden von linearisierten Vektoren durch das Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) dephosphoryliert (30 min, 37°C). DNA-Konzentrationen wurden photometrisch mit dem UV/Vis-Spectrophotometer NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies) bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀) ermittelt. Als Maß für die Reinheit der DNA-Probe diente der Quotient aus A₂₆₀/A₂₈₀.

4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro* Amplifikationsreaktionen erfolgten mit Hilfe der Taq (selbsthergestellt oder von Peqlab) und Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB). Die eingesetzte Menge an Template-DNA, die Komponenten der PCR-Reaktionsansätze und die PCR-Profile wurden gemäß der Herstellerangaben ausgewählt und eingestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden in Analogie zu den Ausführungen von Mullis *et al.* durchgeführt (Mullis *et al.*, 1986). Die verwendeten PCR-Cycler stammten von Eppendorf (Mastercycler).

4.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Gele bestanden aus 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40mM Essigsäure, 1 mM EDTA) und 0,2 µg*mL⁻¹ Ethidiumbromid. Vor dem Auftragen der DNA auf das Gel wurden die Proben mit 10x DNA-Ladepuffer [50% Glycerol (v/v), 0,1 M EDTA, 1% SDS (w/v), 0,1% Bromphenolblau (w/v)] gemischt. Als Standard-DNA-Marker wurde pauschal die 2-Log DNA-Leiter von NEB (0,1-10,0 kb) zur Bestimmung der Proben-DNA-Fragmentgrößen herangezogen. Der Gellauf wurde konstant bei 100 V für 30-45 min in einer „Mini-Sub® DNA Cell GT“- oder einer „Wide Mini-Sub® Cell GT“-Agarosegel-Laufkammer (BioRad) ausgeführt. Die aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei 304 nm sichtbar gemacht und das „Cybertec“-Gel-Dokumentationssystem (Peqlab) bzw. das „Gel Doc™ EZ Imager“-System (BioRad) diente zur Dokumentation der Gele.

4.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction Kit“ (Süd-Laborbedarf) unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution/Konzentrierung der extrahierten DNA erfolgte je nach Stärke der Bande im Agarosegel mit 15-30 µL ddH₂O.

4.4.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse wurde von dem Sequenzierungsservice des Instituts für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) unter Verwendung des „ABI Prism Model 3730“ (Applied Biosystems) mit dem Sequenzierungsprotokoll „Cycle, Clean & Run“ durchgeführt. Die Konzentration der DNA-Probe und der Sequenzierungsprimer, sowie die

Pufferzusammensetzung des Reaktionsansatzes wurden gemäß der Vorgaben der Serviceeinheit eingestellt (www.gi.bio.lmu.de/sequencing/help/protocol). Die Sequenzierung basierte auf dem Prinzip des „Cycle Sequencing“ nach dem von Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1992).

4.4.7 Präparation kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Für den Transfer von replikativen Plasmiden wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen nach einer modifizierten RbCl-Methode präpariert (Hanahan *et al.*, 1991). Zu diesem Zweck wurde eine Übernacht-VK 1:100 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 kultiviert und mittels Zentrifugation geerntet (5 min, 5000 rpm, 4°C, Eppendorf 5804R). Das so generierte Zellpellet wurde in halben Volumen kalter Lösung A (10 mM *N*-Morpholinopropansulfonat (MOPS), pH 7,0, 10 mM RbCl) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme der Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B (100 mM MOPS, pH 6,5, 50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl) erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min auf Eis. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in kalter Lösung B (10% des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für die Transformation verwendet. Dazu wurden 200 µL kompetente Zellen mit 100-200 ng Plasmid-DNA (bzw. pauschal mit 1 µL Plasmid-DNA) oder einem kompletten Ligationsansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (max. 90 sec, 42°C) wurden die Ansätze nach unmittelbarer 2-minütiger Inkubation auf Eis mit je 1 mL LB-Medium oder SOC-Medium (siehe 4.3.1) versetzt und unter Schütteln (11.000 rpm) 1 h bei 37°C aerob inkubiert. Anschließend wurden 100 µL (bei Plasmidtransformationen) oder der komplette abzentrifugierte und in 100 µL LB-Medium aufgenommene Ansatz (bei Transformation von Ligationsansätzen) auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Herstellung superkompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 200 mL-HK im Schikane-Erlenmeyerkolben mit 2 mL der entsprechenden Übernacht-VK angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 kultiviert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4°C, Eppendorf 5804). Das Pellet wurde dann in 100 mL kaltem Transformationspuffer (50 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol, 10 mM PIPES-Puffer, pH 6,6) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4°C) wurde das Zellpellet in 10 mL Transformationspuffer aufgenommen und in Aliquots zu je 100-200 µL in sterilen Eppendorf-Röhrchen portioniert, sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung

bei -80°C gelagert. Das Verfahren der Transformation durch Hitzeschock wurde im Falle der superkompetenten Zellen wie oben für normale kompetente Zellen beschrieben durchgeführt. Für die Transformation von pNPTS138-R6KT-*egfp-lysP* wurden elektrokompente *E. coli* MG1655 gemäß des technischen Protokolls des „Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges, www.genebridges.com/gb/pdf/K006_Ecoli_Gene_Deletion_Kit.pdf) präpariert. 30 µL der kompetenten Zellen wurden mit 400 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Die unverzügliche Elektroporation erfolgte mit einem elektrischen Puls von ~2,5 kV unter Verwendung des „MicroPulser™“-Elektroporators (BioRad). Die weitere Behandlung der elektroporierten Zellen erfolgte in Analogie zum oben skizzierten Protokoll für hitzegeschockte Zellen.

4.4.8 Stammkonstruktion

Die Analyse der CadC- und LysP-vermittelten in vivo Signaltransduktion erfolgte mit dem Reporterstamm *E. coli* EPCD4, der durch Deletion von *lysP* in *E. coli* EP314 (Neely *et al.*, 1994) unter Verwendung der pRED[®]/ET[®] Rekombinationstechnologie in Kombination mit der „*rpsL* Counter Selection“ (Heermann *et al.*, 2008) gemäß dem technischen Protokoll des „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges, www.genebridges.com/gb/pdf/K006_Ecoli_Gene_Deletion_Kit.pdf) generiert wurde. Die Entfernung der inserierten Cm^R-Resistenzkassette aus EP314/*lysP::cat* wurde ebenfalls entsprechend dem „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges) ausgeführt.

Der *E. coli* Stamm JWCD247 für in vivo Transportassays stammt von *E. coli* JW2307 (Δ *argT*) ab (Baba *et al.*, 2006). Die Einführung des *cadB::Kan^R*-Allels mittels P1_{vir}-vermittelter Phagen-Transduktion (Thomason & Costantino, 2007) und Deletion von *lysP* via der pRED[®]/ET[®]-Technik (Heermann *et al.*, 2008) resultierte in JWCD247 ohne jegliches Aufnahmesystem für L-Lysin. Sowohl die Kan^R (Δ *argT*)- und Cm^R (Δ *lysP*)-Resistenzkassette wurden entsprechend dem „Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit“ (Gene Bridges) entfernt.

Im Zuge der Konstruktion von *E. coli* BL21(DE) Δ *cadC* für die Verifizierung der Biosynthese und Membraninsertion von CadC-Varianten wurde die Deletion von *cadC* in BL21(DE) ebenfalls mit Hilfe der pRED[®]/ET[®] Rekombinationstechnologie nach Heermann *et al.* ausgeführt (Heermann *et al.*, 2008).

Zur Generierung von *E. coli* MG-MR1 (*lysP*':':*egfp*) benötigt für die Bestimmung der zellulären LysP-Menge wurden ca. 300 bp stromaufwärts des Startkodons von *lysP* [P_{*lysP*}, (Ruiz *et al.*, 2011)] inklusive der für LysP kodierenden Sequenz ohne Stoppcodon mittels

PCR amplifiziert und zwischen die Schnittstellen BamHI und PspOMI des Suizidvektors pNPTS138-R6KT-*egfp* (J. Lassak, unveröffentlichte Daten) kloniert (pNPTS-R6KT-*egfp-lysP*). Nach Transformation von pNPTS-R6KT-*egfp-lysP* via Elektroporation in *E. coli* MG1655 erfolgte die ortsspezifische Integration des Plasmids in das Genom (C-terminales chromosomales translationales *egfp*-Tagging von *lysP*). Die Selektion der Bakterien mit chromosomal integriertem Plasmid fand durch Wachstum auf LB-Agar unter Zusatz von Kanamycinsulfat statt. Kanamycinsulfatresistente Stämme wurden mittels Kontroll-PCR auf Integration von *lysP*::*egfp* untersucht.

4.4.9 Plasmidkonstruktion

Alle verwendeten Plasmide und die Konstruktionswege der im Rahmen dieser Arbeit neu generierten Vektoren sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Nukleotidsequenzen aller hergestellten Plasmide wurden mittels Sequenzanalyse (siehe 4.4.6) überprüft.

4.4.9.1 Ungerichtete Mutagenese von *lysP*

Die im Rahmen dieser Arbeit betreute Diplomarbeit von B. Weckerlein fokussierte auf die ungerichtete Mutagenese von *lysP* (Weckerlein, 2010). Dabei wurden (i) in vitro chemische Mutagenese mit Hydroxylaminhydrochlorid (Rimon *et al.*, 1995), (ii) der Mutagenese-Stamm *E. coli* XL1-Red (Greener *et al.*, 1997) und (iii) in vitro PCR-Mutagenese mit limitiertem dATP (Kuipers, 1996) als Mutagenesemethoden herangezogen (detaillierte Darstellung dieser Techniken inklusive dem Screeningtest siehe Weckerlein, 2010). Alle auf diesem Wege identifizierten Aminosäurepositionen in LysP, deren Substitution einen veränderten/defekten regulatorischen Phänotyp bedingte, wurden dann in einem weiteren Mutageneseansatz in Kooperation mit B. Weckerlein und Dr. L. Tetsch zielgerichtet ausgetauscht (siehe 4.4.9.2).

4.4.9.2 Zielgerichtete Mutagenese von *lysP*

Zielgerichtete Mutagenese des *lysP*-Gens wurde mittels 1- oder 2-Stufen-PCR mit synthetischen Primern, die die gewünschten Mutationen enthielten, erzielt (Ho *et al.*, 1989). Alle verwendeten „Mismatch-Primer“ sind in Tab. 4 zusammengefasst. Das Plasmid pBAD33-*lysP* (Tetsch *et al.*, 2008) fungierte als Template für die jeweiligen PCR-Reaktionen und als Empfänger-Vektor für die auf diesem Wege generierten mutierten DNA-Fragmente. Die verwendeten unterschiedlichen Restriktionsenzyme sind in Tab. 3 in Spalte Genotyp/Konstruktion aufgelistet. Somit stand die Expression aller LysP-Varianten unter der

Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotors. Alle LysP-Varianten wiesen nach Klonierung in pBAD33-*lysP* eine C-terminale Fusion mit einem His₆-Tag für die Immunodetektion auf. Die Substitution der aromatischen Aminosäuren von LysP erfolgte in Kooperation mit V. Schüppel, deren Diplomarbeit im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde (Schüppel, 2011). Einige in Tab. 3 aufgelisteten LysP-Varianten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. L. Tetsch hergestellt.

4.4.9.3 Zielgerichtete Mutagenese von *cadC*

Die CadC-Varianten CadC-R265Q_R268Q, CadC-N263K/Q und CadC-Q266P/N wurden ebenfalls mittels 2-Stufen-PCR und „Mismatch-Primern“ konstruiert. Als Template für die PCR fungierte der Vektor pET16b-*cadC2* (Küper & Jung, 2005). Die so resultierenden DNA-Fragmente wurden zwischen die Restriktionsstellen für NcoI und BamHI des Expressionsvektors pET16b-*cadC2* kloniert, so dass die Expression aller CadC-Varianten unter der Kontrolle des T7-Promotors stand und alle Varianten einen N-terminalen His₁₀-Tag trugen.

4.4.9.4 Konstruktion von CadC- und LysP-Chimären für in vivo BACTH-Studien

Protein-Protein-Interaktionen wurden mit Hilfe des *Bacterial adenylate cyclase two-hybrid* (BACTH)-Systems analysiert, das auf der funktionalen Rekonstitution der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* beruht (Karimova *et al.*, 1998). Für die Generierung der BACTH-Vektoren wurden die Zielgene *lysP* und *cadC* via PCR von der genomischen DNA von *E. coli* MG1655 als Template amplifiziert und zwischen die XbaI und BamHI Schnittstellen der Plasmide pKT25, pKNT25, pUT18C und pUT18 (Euromedex, Straßburg) kloniert (pKT25-*lysP*, pKNT-*lysP*, pUT18C-*lysP*, pUT18-*lysP*, pKT25-*cadC*, pUT18C-*cadC*, S. Ude, unveröffentlicht).

Die korrespondierenden Volllängen *cadC*-PCR-Fragmente im Zuge der Konstruktion der BACTH-Plasmide pKT25-*cadC*_ΔF159-F165, pKT25-*cadC*_F165A, pKT25-*cadC*_C208A_C272A, pKT25-*cadC*_176-RPQLV-177 und pKT25-*cadC*_ΔS188-R191 stammten von den Template-Plasmiden pET16b-*cadC*_ΔF159-165, pET16b-*cadC*_F165A (Tetsch *et al.*, 2008), pET16b-*cadC*_C208A,C272A (Tetsch *et al.*, 2011), pET16b-*cadC*_6_176-RPQLV-177 (S. Buchner, unveröffentlicht) und pET16b-*cadC*_ΔS188-R191 (L. Tetsch, unveröffentlicht) und wurden nach Restriktion mit den Enzymen XbaI und BamHI in pKT25 integriert.

Die verkürzte CadC-Variante CadC1-215, 3'-fusioniert mit *malE*, existierte bereits in Vektor pT7-5 [pT-*cadC1-215-malE*, (Kraxenberger, 2006)] und konnte daher einfach nach Amplifikation via PCR (PCR-Produkt: *cadC1-215-malE*) zwischen die BamHI und EcoRI Schnittstellen von pKT25 inseriert werden. Der so generierte Vektor pKT25-*cadC1-215-malE* diente für alle weiteren konstruierten *malE*-Fusionen (siehe unten) im Zuge des Screenings nach Positionen in CadC, die an der Interaktion mit LysP beteiligt sind, als Empfängerplasmid für die korrespondierenden PCR-Produkte. Dabei resultierte die generelle Restriktion mit BamHI und NheI in der Exzision von *cadC1-215*. Basierend auf der MalE-Fusionsstrategie nach Jung *et al.* (Jung *et al.*, 2007) wurden verkürzte CadC-Varianten mit unterschiedlichem Domänenaufbau (CadC159-178, CadC1-178, CadC1-192, CadC1-159-PutPTM4) C-terminal mit dem Signalsequenz-defizienten *malE*-Gen (MBP) und N-terminal an das T25-Fragment (pKT25) fusioniert. Die Nukleotidsequenzen, kodierend für CadC159-178, CadC1-178 und CadC1-192 wurden via PCR vom Plasmid pET16b-*cadC2* (Küper & Jung, 2005) amplifiziert. Als Matrize für die Amplifikation der chimären Nukleotidsequenz CadC1-159-PutPTM4 diente der Vektor pET16b-*cadC_putP_TM4* (Tetsch *et al.*, 2008). Jedes so erhaltene CadC-PCR-Fragment wurde zwischen die Restriktionsstellen BamHI und NheI in pKT25-*cadC1-215-malE* kloniert, um die Fusion mit *malE* und T25 zu generieren. Die verkürzten Varianten CadC107-512 und CadC159-512 wurden nach PCR-Amplifizierung der entsprechenden *cadC*-Teile von pET16b-*cadC2* und Klonierung in pKT25 (via XbaI und BamHI) generiert.

Für die Konstruktion von pKT25-PutPTM10-CadC179-512 wurde der korrespondierende Teil von *cadC* ebenfalls von pET16b-*cadC2* (flankiert von KpnI und EcoRI) und der Part von *putP*, kodierend für TM-Helix 10, von genomischer DNA von *E. coli* MG1655 (flankiert von XbaI und KpnI) amplifiziert und durch eine Doppelligation zwischen die XbaI und EcoRI Stellen in pKT25 inseriert.

Das Konstrukt T18-LysP-D275A_D278A wurde durch Amplifikation der Nukleotidsequenz *lysP*-D275A_D278A via PCR von Plasmid pBAD33-*lysP*-D275A_D278A und Klonierung dieses Fragments zwischen die Schnittstellen XbaI und KpnI von pUT18C hergestellt. Diese Chimäre trug außerdem einen C-terminalen His₆-Tag zur Immunodetektion.

Als Matrize für die PCR im Zuge der Generierung der „Single-Helices“-LysP-Chimären T25-LysPTM7/Wt-MPB und T25-LysPTM/D275A_D278A-MBP diente pBAD33-*lysP* bzw. pBAD33-*lysP*-D275A_D278A. Nach Amplifikation des entsprechenden Teils von *lysP*, der für die TM-Helix 7 inklusive der darauffolgenden periplasmatischen Schleife mit und ohne

Mutationen kodiert, erfolgte die Ligation dieser Fragmente (flankiert von BamHI und NheI) zwischen die Schnittstellen BamHI und NheI von pKT25-*cadC1-215-malE*.

Die Plasmide pKT25-*zip* und pUT18C-*zip* wurden als Bestandteil des BACTH-Kits (Euromedex, Straßburg) bezogen und dienten als Positivkontrollen für Interaktion.

4.4.9.5 Klonierung von *lysP*-Orthologen

Um den Effekt von LysP-Orthologen auf die CadC-vermittelte *cadBA* Expression in *E. coli* zu untersuchen, wurde *lysP* von *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 mittels PCR von genomischer DNA von *P. luminescens* amplifiziert und nach Restriktion mit NcoI und HindIII mit pBAD33-*lysP* ligiert (pBAD33-*lysP-plu*). Für die spätere Immunodetektion trug dieses *lysP*-Ortholog einen His₆-Tag.

Als weitere alternative LysP-Proteine wurden die LysP-Orthologen von *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* und *Helicobacter pylori* P12 ausgewählt. Die Konstruktion der Plasmide pBAD33-*lysP-mlu*, pBAD33-*lysP-bme*, pBAD33-*lysP-sca* und pBAD33-*lysP-hpy* erfolgte im Zuge der im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelor-Arbeit von M. Wieland (Wieland, 2013).

4.5 Biochemische und analytische Methoden

4.5.1 Präparation von invertierten Membranvesikeln und Zytosol

4.5.1.1 Präparation von CadC-Membranvesikeln für die Reinigung von CadC

Die Präparation von CadC-Membranvesikeln (*E. coli* BL21(DE)pLysS-pET16b-*cadC2*) basierte auf dem Protokoll von Siebers und Altendorf (Siebers & Altendorf, 1988) mit leichten Modifikationen gemäß Jung und Mitarbeitern (Jung *et al.*, 1997). 0,2 g Zellpellet (Feuchtgewicht) wurden je in 1 mL Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 30 ng*mL⁻¹ DNase A) resuspendiert und nach Zugabe von 10 µg*mL⁻¹ Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (25 sec, Puls 0,5 sec/0,5 sec, Amplitude 20%, Digital Sonifier® W-205D, Branson) aufgeschlossen und die Zelltrümmer wurden via niedertouriger Zentrifugation abgetrennt (10 min, 16.000 rpm, 4°C, Eppendorf 5804R). Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation unterzogen (1 h, 45.000 rpm, 4°C, Sorvall® WX Ultra 90 oder Beckman Coulter Optima™ L-90K). Nach einem Waschschrift des Membranpellets mit niederionischem Waschpuffer (1 mM Tris/HCl, pH 7,5, 3 mM

EDTA, pH 8,0, 0,5 mM PMSF) und eines erneuten Ultrazentrifugationsschrittes (1 h, 45.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in TG-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.5.1.2 Präparation von LysP-Membransvesikeln für die Reinigung von LysP

Die Präparation von LysP-Membranvesikeln (BL21(DE)pLysS-pT-*lysP*) erfolgte in Analogie zum Protokoll von Jung *et al.* (Jung *et al.*, 2002). 0,2 g Zellpellet wurden je in 1 mL Aufschlusspuffer (50 mM KPi-Puffer, pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol, 0,5 mM PMSF, 30 ng*mL⁻¹ DNase A) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (25 sec, Puls 0,5 sec/0,5 sec, Amplitude 20%, Digital Sonifier® W-205D, Branson) aufgeschlossen und Zelltrümmer wurden via niedertouriger Zentrifugation abgetrennt (15 min, 10.000 rpm, 4°C, Eppendorf 5804R). Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation unterzogen (1 h, 45.000 rpm, 4°C, Zentrifugen siehe 4.5.1.1). Nach einem Waschschrift des Membranpellets mit Waschpuffer (50 mM KPi-Puffer, pH 7,5, 2 mM β -Mercaptoethanol) folgte ein weiterer Ultrazentrifugationsschritt (1h, 45.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in Waschpuffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

4.5.1.3 Isolation von Zytosol für die Reinigung von eGFP

Der Aufschluss der Zellen (BL21(DE)pLysS-pET21a-*egfp*), die Abtrennung der Zelltrümmer und die Separation von Membranen und Zytosol wurde wie in 4.5.1.1 beschrieben durchgeführt. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt wurde der Überstand (Zytosol), der das lösliche eGFP enthielt, schockgefroren und bei -80°C verwahrt.

4.5.1.4 Separation von Membranen und Zytosol zur Kontrolle der Membraninsertion

Die generierten Zellpellets wurden pauschal in 3 mL Aufschlusspuffer aufgenommen. Die Pufferzusammensetzungen, der Zellaufschluss und die Separation von Membranvesikeln und Zytosol wurden wie in 4.5.1.1 skizziert eingestellt und ausgeführt. Ein 1 mL-Aliquot des Zytosols und das Membranpellet [je nach Größe resuspendiert in ca. 50 μ L TG-Puffer (siehe 4.5.1.1)] wurden nach Schockfrostung bei -20°C aufbewahrt.

4.5.2 Reinigung von Proteinen

4.5.2.1 Reinigung von His₁₀-CadC

His₁₀-CadC wurde mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gemäß des bereits beschriebenen Protokolls von Küper und Jung gereinigt (Küper & Jung, 2005): Die gewaschenen Membranvesikel wurden durch Zugabe des Solubilisierungspuffers (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,15 M NaCl) auf eine finale Proteinkonzentration von 4 mg*mL⁻¹ eingestellt (Volumen des Solubilisierungsansatzes: 10 mL). Unter Rühren auf Eis erfolgte die Extraktion von CadC aus den Membranen durch schrittweises Zutropfen von 3 mL 6,67% N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid [LDAO, finale Konzentration: 2% (v/v)]. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die solubilisierten Proteine durch einen Ultrazentrifugationsschritt (1h, 45.000 rpm, 4°C, Zentrifugen siehe 4.5.1.1) von den Membranen separiert. Aus dem so erhaltenen Überstand wurde His₁₀-CadC via Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Säule mit 400 μ L (ergibt 200 μ L abgesetzte Matrix) des Ni²⁺-NTA-Agarosegemisches bei 4°C gereinigt. Nach zweimaligem Waschen der Matrix mit je 10 mL ddH₂O und zweimaliger Äquilibration mit je 10 mL Äquilibrationpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 0,2% (v/v) LDAO, 30 mM Imidazol, 600 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol) wurde der Überstand (mit His₁₀-CadC, versehen mit 600 mM NaCl und 30 mM Imidazol) auf die Säulenmatrix gegeben. Die Durchflussfraktion wurde unmittelbar ohne Inkubationsschritt abgenommen. Das Waschen der Säule zur Entfernung von unspezifisch oder locker gebundenem Protein erfolgte dreimal mit 4 mL Äquilibrationpuffer. CadC wurde in 6 Fraktion zu je 1 mL eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurde vor der eigentlichen Elution die Säulenmatrix mit 1 mL Elutionspuffer (= Äquilibrationpuffer, 250 mM Imidazol) versetzt, gut durchmischt und ca. 5-10 min inkubiert. Bis zur Verwendung wurde gereinigtes CadC nach Schockgefrierung bei -80°C gelagert.

4.5.2.2 Reinigung von LysP-His₆

Die gewaschenen Membranvesikel wurden durch Zugabe des Solubilisierungspuffers (50 mM KP_i, pH 8,0, 10% (v/v) Glycerol, 2 mM β -Mercaptoethanol) auf eine finale Proteinkonzentration von 5 mg*mL⁻¹ eingestellt (Volumen des Solubilisierungsansatzes: 10 mL). Unter Rühren auf Eis erfolgte die Extraktion von LysP aus den Membranen durch schrittweises Zutropfen von 0,81 mL 20% *n*-Dodecyl- β -D-maltosid [DDM, finale

Konzentration: 1,5% (w/v)]. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die solubilisierten Proteine durch einen Ultrazentrifugationsschritt (1h, 45.000 rpm, 4°C, Zentrifugen siehe 4.5.1.1) von den Membranen separiert. Aus dem so erhaltenen Überstand wurde LysP-His₆ via Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Säule mit 2 mL (ergibt 1 mL abgesetzte Matrix) des Ni²⁺-NTA-Agarosegemisches bei 4°C gereinigt. Nach Waschen der Matrix mit 100 mL ddH₂O und Äquilibration mit 50 mL Äquilibrationpuffer (100 mM KPi, pH 8,0, 10% (v/v) Glycerol, 0,04% (w/v) DDM, 10 mM Imidazol, 300 mM KCl, 2 mM β-Mercaptoethanol) wurde der Überstand (mit LysP-His₆, versehen mit 300 mM KCl und 10 mM Imidazol) auf die Säulenmatrix gegeben. Die Durchflussfraktion wurde unmittelbar ohne Inkubationsschritt abgenommen. Das Waschen der Säule zur Entfernung von unspezifisch oder locker gebundenem Protein erfolgte mit 15 mL Waschpuffer (Äquilibrationpuffer, 10 mM Imidazol). LysP wurde in 6 Fraktion zu je 1 mL eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurde vor der eigentlichen Elution die Säulenmatrix mit 1 mL Elutionspuffer (100 mM KPi, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 0,04% DDM, 250 mM Imidazol, 300 mM KCl, 2 mM β-Mercaptoethanol) versetzt, gut durchmischt und ca. 5-10 min inkubiert. Bis zur Verwendung wurde gereinigtes LysP nach Schockgefrierung bei -80°C gelagert.

4.5.2.3 Reinigung von eGFP-His₆

Aus dem zytosolischen Überstand nach Abtrennung der Membranen wurde eGFP-His₆ via Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Säule mit 1 mL (ergibt 0,5 mL abgesetzte Matrix) des Ni²⁺-NTA-Agarosegemisches bei 4°C gereinigt (eingesetzte Proteinkonzentration: 20 mg*mL⁻¹). Nach Waschen der Matrix mit 100 mL ddH₂O und Äquilibration mit 30 mL Äquilibrationpuffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM DDT] wurde das Zytosol (mit eGFP-His₆, versehen mit 150 mM NaCl und 10 mM Imidazol) auf die Säulenmatrix gegeben. Die Durchflussfraktion wurde unmittelbar ohne Inkubationsschritt abgenommen. Das Waschen der Säule zur Entfernung von unspezifisch oder locker gebundenem Protein erfolgte mit 30 mL Waschpuffer (Äquilibrationpuffer, 20 mM Imidazol). eGFP wurde in 6 Fraktion zu je 1 mL eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurde vor der eigentlichen Elution die Säulenmatrix mit 1 mL Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerol, 250 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM DDT) versetzt, gut durchmischt und ca. 5-10 min inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurde gereinigtes eGFP nach Schockgefrierung bei -80°C gelagert.

4.5.3 Rekonstitution von LysP und Co-Rekonstitution von CadC und LysP

Gereinigtes LysP und CadC wurde in Liposomen (co-)rekonstituiert, die nach dem Protokoll von Jung *et al.* aus Aceton-/Ether-gewaschenen *E. coli* Phospholipiden präpariert wurden (Jung *et al.*, 1998). Abwandlung der Liposomen-Präparation: die Pufferkomponente bestand aus 50 mM KP_i , pH 7,6. Die Detergenz-vermittelte (Co-)Rekonstitution wurde gemäß der von Jung *et al.* modifizierten Methode basierend auf dem Protokoll von Rigaud und Mitarbeiter durchgeführt (Rigaud *et al.*, 1995, Jung *et al.*, 1998). LysP wurde in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 100:1 bzw. LysP und CadC wurden im Verhältnis von 100:1:1,11 (co-)rekonstituiert. Für die Entfernung der verwendeten Detergenzien [Triton X-100 (Liposomen), DDM (LysP), LDAO (CadC)] wurden BioBeads in spezifischem Verhältnis zu der eingesetzten Menge an Detergenz zu den Lipid-Protein-Ansätzen gegeben (BioBeads:Triton X-100 \rightarrow 5:1; BioBeads:DDM \rightarrow 10:1; BioBeads:LDAO \rightarrow 10:1). Die fertigen Proteoliposomen wurden in 100 mM KP_i , pH 7,6, 2 mM β -Mercaptoethanol aufgenommen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu der Weiterverwendung im Zuge von in vitro Transportmessungen bei -80°C verwahrt. Zur Überprüfung der LysP- und LysP/CadC-Proteoliposomen wurden Aliquots beider Proben per Immunoblot analysiert. Die prozentualen Anteile von LysP und CadC in den LysP/CadC-Proteoliposomen wurden anhand dieser Blots visuell abgeschätzt und unter Berücksichtigung der experimentell bestimmten Gesamtproteinmenge kalkuliert.

4.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Membranvesikeln, Zytosol und von gereinigten Proteinen (LysP, CadC, eGFP) wurde gemäß Lowry *et al.* mit Modifikationen bestimmt (Lowry *et al.*, 1951, Peterson, 1977). Alternativ wurde die Konzentration von gereinigtem CadC via UV-Absorption mittels des UV/Vis-Spectrophotometers NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies) bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) gemäß dem Gesetz von Lambert und Beer anhand der Gleichung $A_{280} = \epsilon \cdot c \cdot d$ ermittelt, wobei ϵ : Extinktionskoeffizient [$L \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$], c : Proteinkonzentration [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$], d : Schichtdicke der Küvette [cm].

Die Bestimmung niedrigerer Proteinkonzentrationen (0,5-30 μg) der LysP/CadC- und LysP-Proteoliposomen erfolgte nach dem Prinzip der Amidoblack-Proteinbestimmung nach Kaplan und Pedersen (Kaplan & Pedersen, 1985).

4.5.5 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) gemäß Laemmli (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration der Sammelgele betrug 4,9% (w/v) und der Trenngele 12,5% (w/v). Vor Beladen der Gelspuren wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer [25 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,005% (w/v) Bromphenolblau] versetzt. Als Marker wurde entweder der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“ (14-116 kDa, Fermentas) oder der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (10-170 kDa, Thermo Scientific) aufgetragen. Der Gellauf wurde in den Kammern „PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S oder Twin M“ (Peglab) bei 200 V in Laemmli-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,4-8,9) ausgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels folgender Prozedur angefärbt:

- 1) Herstellung der Coomassie Brilliant Blau (CBB)-Färbelösung: 60-80 mg Brilliant Blau G250 (Roth) in 1 L ddH₂O lösen (2-3 h bei Raumtemperatur). Dann HCl mit einer finalen Konzentration von 35 mM dazugeben (nicht mehr als 50 mM!) und vor Licht geschützt verwahren.
- 2) Färben der Gele: Gel mit ca. 20-30 mL ddH₂O versetzen und ca. 30 sec in der Mikrowelle erhitzen, dann 2-5 min auf der Wippe schwenken (Schritt 3x wiederholen). Nach Zugabe der CCB-Lösung 10 sec in der Mikrowelle erhitzen und anschließend unter Schwenken 10-15 min färben. Mit ddH₂O waschen.

4.5.6 Western Blot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Nassblot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, BioRad) auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 μ m Porendurchmesser, Whatman™, Protran BA85) transferiert. Die horizontale Elektrophorese erfolgte 90 min bei 300 mA (oder über Nacht bei 100 mA) für kleine Gele (10 x 10 cm) und 90 min bei 800 mA (oder über Nacht bei 200 mA) für große Gele (14 x 16 cm). Die immunologische Detektion der Proteine wurde gemäß dem Protokoll 8 des „QIAexpress Detection and Assay Handbook 10/2002“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Für den Nachweis von Proteinen mit Histidin (His)-Tags wurde als primärer Antikörper der Penta-His-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Qiagen) in einer Endkonzentration von 1:2000

verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein mit alkalischer Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Rockland) in einer finalen Konzentration von 1:5000.

Bei der Detektion von CadC wurde die Blotmembran zuerst mit einem spezifischen präabsorbierten CadC-Antikörper (Hase, 1:10.000) inkubiert. Dann folgte der Zusatz eines mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Anti-Hase-IgG-Antikörpers (1:2500, Rockland). Für den Nachweis von eGFP fand als primärer Antikörper der Anti-GFP-Maus-IgG-Antikörper der Firma Roche Diagnostics Anwendung (1:1000). Als sekundärer Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Rockland) in einer finalen Konzentration von 1:5000 verwendet.

Als finaler Schritt wurde der Immunoblot durch Zugabe von Färbelösung [50 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5, 0,01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT), 0,045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)] entwickelt (Entwicklungszeit ~5-15 min).

4.5.7 Quantitative β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

Der durchgeführte Assay zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität basierte auf den Ausführungen von Tetsch *et al.* (Tetsch *et al.*, 2008). Das Zellpellet wurde in 1 mL Puffer Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μL Chloroform und 0,1% (v/v) SDS wurden die Zelllysate 5 min bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 μL ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (oNPG, 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) als Substrat der β -Galaktosidase. Beim Eintreten sichtbarer Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 500 μL Natriumcarbonat (1 M) gestoppt (maximale Reaktionsdauer: 10 min). Das Zelllysate wurde unmittelbar nach dem Abstoppen zentrifugiert (5 min, 13.200 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf 5424). Die Intensität der Gelbfärbung wurde photometrisch durch Messung der A_{420} determiniert. Die Kalkulation der Enzymaktivitäten [in Miller Units (MU)] erfolgte gemäß Miller (Miller, 1992).

4.5.8 In vivo Studien zur Interaktion von Proteinen (BACTH)

Protein-Protein-Interaktionen wurden mit Hilfe des BACTH-Systems analysiert (Karimova *et al.*, 1998). Dieses System beruht auf der funktionalen Rekonstitution der T18- und T25-Untereinheiten der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis*, deren katalytische Aktivität die Basis der CRP- (engl. cAMP receptor protein) induzierten Expression von *lacZ* repräsentiert (siehe Abb. 6). Die resultierende zytosolische β -Galaktosidase-Aktivität kann so als Maß für

die Stärke der Protein-Protein-Interaktion durch die Spaltung von oNPG ermittelt werden. Die β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in 4.5.7 beschrieben.

4.5.9 In vivo Fluoreszenzmikroskopie

Für den Nachweis der Produktion und Membraninsertion des LysP-eGFP-Fusionsproteins wurden bei Raumtemperatur Fluoreszenzbilder von einem Aliquot der frischen Zellsuspension von *E. coli* MG-MR1 (*lysP*::*egfp*) mit Hilfe des „Leica DMI 6000 B“-Mikroskops, einem Öl-Immersion Objektiv und der monochromen „Leica DFC365 FX“-Digitalkamera aufgenommen. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wurde der Bandpass-Filter BP470/40 (grün) und der Emissions-Filter 525/50 (grün) verwendet.

4.5.10 In vivo Transportmessungen

4.5.10.1 In vivo Transportassay

Die Aufnahme von 10 μM L-[^{14}C]Lysin (26 $\text{Ci}\cdot\text{mol}^{-1}$, Hartmann Analytik) in 200 μL *E. coli* JWCD247 (transformiert mit den korrespondierenden LysP-Varianten in pBAD33) wurde in Gegenwart von 20 mM D-Laktat (Na^+ -Salz) als Elektronendonator bei 25°C unter aeroben Bedingungen getestet (Start der Reaktion mit Zugabe von L-[^{14}C]Lysin). Zu definierten Zeitpunkten (0, 0,17, 0,5, 1, 2, 5, 10, 30 min) resultierte die Zugabe von 2,5 mL eiskaltem Stopp-Puffer (100 mM KH_2PO_4 , 100 mM LiCl, pH 6,0) in der Termination der Transportreaktion. Unverzüglich wurde der Transportansatz mit Hilfe der Schnell-Filtrations-Methode gemäß Quick *et al.* filtriert [(Quick *et al.*, 1996), Filter: Macherey-Nagel MN GF-5]. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach Zugabe von 4,5 mL „EcoLumeTM Liquid Scintillation Cocktail“ (MP Biomedicals) im β -Counter (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb[®] 2910 TR, Perkin Elmer). Die Kalkulation der Initialraten basierte auf dem linearen Bereich der Zeitverläufe (angegeben in $\text{nmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg Protein})^{-1}$).

4.5.10.2 Kinetische Studien

Für kinetische Analysen wurde der L-[^{14}C]Lysin-Transport mit Lysin-Substratkonzentrationen von 0,125 bis 250 μM gemessen.

4.5.10.3 Substratspezifität von LysP

Ausgewählte L-Aminosäuren, Polyamine und Lysinanaloga (siehe Abb. 24) wurden in 100 mM Tris/MES-Puffer (pH 7,6, 5 mM MgCl₂) gelöst. Die nicht radioaktiven Testsubstrate wurden dann im 100-fachen Überschuss (finale Endkonzentration: 1 mM) unmittelbar vor Start der Transportreaktion mit 10 µM L-[¹⁴C]Lysin zu 200 µL Bakteriensuspension (JWCD247-pBAD33-*lysP*) gegeben.

4.5.10.4 Inhibitoranalyse

Die Wasser-löslichen Substanzen 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Kaliumcyanid wurden in 100 mM Tris/MES-Puffer (pH 7,6, 5 mM MgCl₂) gelöst, während die Stocklösung von Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) mit absolutem EtOH als Lösungsmittel hergestellt wurde. Die Verdünnung dieser EtOH-Stocklösungen in Tris/Mes-Puffer (pH 7,6, 5 mM MgCl₂) garantierte eine finale EtOH-Konzentration in den Zellsuspensionen von weniger als 1% (v/v). 200 µL Zellen (JWCD247-pBAD33-*lysP*) wurden mit den oben aufgelisteten Inhibitoren in unterschiedlichen Endkonzentrationen (siehe Abb. 25) und als Kontrolle mit 1% (v/v) EtOH gemäß Mendz *et al.* für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Mendz *et al.*, 1998). Danach erfolgte der Start der Transportreaktion mit 10 µM L-[¹⁴C]Lysin.

4.5.11 In vitro Transportmessungen

4.5.11.1 In vitro Transportassay mit LysP- und LysP/CadC-Proteoliposomen

Ein Aliquot der eingefrorenen Proteoliposomen (in 100 mM KPi, pH 7,6, 2 mM β-Mercaptoethanol) wurde aufgetaut und mit Puffer 1 auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg*mL⁻¹ eingestellt. Nach Extrudieren mit 400 nm Membranen, um unilamellare Proteoliposomen der gleichen Größe zu erhalten, wurden die Proteoliposomen durch einen Ultrazentrifugationsschritt (30 min, 80.000 rpm, 20°C, Mini-Ultrazentrifugen: Beckman Coulter Optima™ TLX oder Sorvall® Discovery M120) konzentriert. Um eine Proteinkonzentration von 1 mg*mL⁻¹ zu erhalten wurde das weißliche Pellet in dem entsprechenden Volumen Puffer 1 resuspendiert. Die Proteoliposomen wurden bis zu den in vitro Transportassays bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Transportansätze setzten sich aus je 400 µL Puffer (Puffer 1-7, siehe 4.5.11.2) versetzt mit 10 µM L-[¹⁴C]Lysin und 0,2 µM Valinomycin (in EtOH) zusammen. Der Start der Transportreaktionen erfolgte durch Zugabe

von 1 μL LysP- oder LysP/CadC-Proteoliposomen (in Puffer 1). Nach Inkubation der Reaktionsansätze bei 25°C wurde das Abstoppen der Reaktionen und das unverzügliche Filtrieren der Proteoliposomensuspension durch „Millipore® GSTF02500“- Filter (0,22 μm Porengröße) wie in 4.5.10.1 beschrieben ausgeführt.

4.5.11.2 Effekt von artifiziell generierten (Ionen-)Gradienten auf den Lysintransport

Um den Effekt von artifiziell erzeugten (Ionen-)Gradienten auf den LysP-vermittelten Lysintransport zu analysieren, wurden die LysP- bzw. LysP/CadC-Proteoliposomen 400-fach in den folgenden Puffern 1-7 verdünnt:

Puffer 1 (Kontrolle): 100 mM KPi , pH 7,6 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol	Puffer 2 ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$): 100 mM Tris/Mes, pH 5,8 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol	Puffer 3 ($\Delta\mu_{\text{H}^+}+\text{Na}^+$): 100 mM Tris/Mes, pH 5,8 50 mM NaCl 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol
Puffer 4 ($\Delta\Psi$): 100 mM Tris/Mes, pH 7,6 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol	Puffer 5 ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$): 100 mM Tris/Mes, pH 7,6 50 mM NaCl 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol	Puffer 6 ($\Delta\mu_{\text{Li}^+}$): 100 mM Tris/Mes, pH 7,6 50 mM LiCl 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol
Puffer 7 (ΔpH): 100 mM KPi , pH 5,8 5 mM MgCl_2 2 mM β -Mercaptoethanol		

Die in Klammern angegebenen durch die korrespondierenden Puffer generierten (Ionen-) Gradienten beziehen sich auf die Analyse der LysP- und LysP/CadC-Proteoliposomen in 100 mM KPi , pH 7,6.

4.5.11.3 Effekt von variierenden $\Delta\Psi$ auf den Lysintransport

Verschiedene Membranpotentiale wurden mittels unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen der Reaktionspuffer (Puffervolumen: 400 μL) generiert. Folgende Konzentrationen der KPi -Pufferkomponente (pH 7,6) wurden ausgewählt: 0, 0,38, 1,5, 6,25, 25 bzw. 100 mM. Dementsprechend wurden 0, 1,5, 6, 25, 100 bzw. 400 μL des 100 mM KPi -Puffers (pH 7,6) in die Reaktionsgefäße gegeben und mit 100 mM Tris/Mes-Puffer (pH 7,6) auf 400 μL aufgefüllt und mit 5 mM MgCl_2 , 10 μM $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{Lysin}$ und 0,2 μM Valinomycin (in EtOH)

versetzt. Durch Zugabe von 1 μL LysP-Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6) wurden die Transportreaktionen gestartet.

Unter Berücksichtigung der 1 μL LysP-Proteoliposomensuspension (in 100 mM KPi , pH 7,6), mit der die Transportreaktion gestartet wurde, und der Nernst-Gleichung wurden die korrespondierenden Membranpotentiale berechnet: -153,52, -130,04, -103,66, -70,04, -35,27 bzw. 0 mV.

4.5.11.4 Effekt von variierenden pH-Werten auf den Lysintransport

Um den Einfluss verschiedener pH-Werte auf die LysP-vermittelte Transportaktivität zu testen, wurden die LysP-Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6) 400-fach in 100 mM Tris/Mes, pH 5-9, versetzt mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM MgCl_2 , 0,2 μM Valinomycin und 10 μM L- $[^{14}\text{C}]$ Lysin, verdünnt.

4.5.11.5 Counterflow- und Antiportexperimente

Für Austauschexperimente wurden die LysP-Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6) mit je 10 mM L-Lysin, β -Lysin und Cadaverin (jeweils gelöst in 100 mM Tris/Mes, pH 7,6) äquilibriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben durch 400 nm Membranen extrudiert und mittels Ultrazentrifugation (30 min, 80.000 rpm, 20°C, Mini-Ultrazentrifugen siehe 4.5.11.1) konzentriert und mit Puffer 1 auf eine Proteinkonzentration von 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ eingestellt. Aliquots (1 μL) dieser Proteoliposomensuspension wurden dann in 400 μL Puffer 1 plus 10 μM L- $[^{14}\text{C}]$ Lysin verdünnt. Folglich ergab sich beim L-Lysin-Counterflowexperiment (Vorladen mit 10 mM L-Lysin) eine externe finale L-Lysinkonzentration von 35 μM .

4.5.11.6 Generierung von Proteoliposomen in 100 mM KPi , pH 5,8

Die Herstellung von LysP-Proteoliposomen in 100 mM KPi , pH 5,8 erfolgte durch Äquilibrierung der Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6) mit Puffer 7. Nach mehreren Schockgefrierungs- und Auftauzyklen wurden die Proteoliposomen nach Extrudieren mit 400 nm Membranen durch Ultrazentrifugation konzentriert und mit Puffer 7 auf eine Proteinkonzentration von 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ justiert. Diese LysP-Proteoliposomensuspension wurde dann 400-fach in Puffer 7 (Kontrolle), 4 ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), 2 ($\Delta\Psi$) und 1 (ΔpH), supplementiert mit 0,2 μM Valinomycin und 10 μM L- $[^{14}\text{C}]$ Lysin, verdünnt. Die in Klammern angegebenen durch

die korrespondierenden Puffer generierten (Ionen-)Gradienten beziehen sich auf die Analyse der LysP-Proteoliposomen in 100 mM KPi , pH 5,8.

4.5.11.7 Bestimmung des internen Proteoliposomenvolumens

Die Bestimmung des internen Proteoliposomenvolumens basierte auf dem Protokoll von Garcia *et al.* (Garcia *et al.*, 1983). Die Äquilibration der LysP-Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6) erfolgte mit der Original L- ^{14}C Lysin-Lösung (0,347 mM, 288 $\text{Ci}\cdot\text{mol}^{-1}$). Gemäß der Kalkulation von Garcia *et al.* haben demnach 1 μL Proteoliposomen, die 0,288 μg Protein (LysP) enthalten, ein internes Volumen von 0,0406 μL (Garcia *et al.*, 1983).

4.5.11.8 Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$

Die experimentelle Quantifizierung der artifiziell generierten elektrischen Potentiale über der LysP-Proteoliposomenmembran (siehe 4.5.11.3) beruhte auf der Eigenschaft des lipophilen Tetraphenylphosphonium Kations (TPP^+) die Proteoliposomenmembran passieren zu können. Die Akkumulation und Äquilibration von TPP^+ ist abhängig von der jeweiligen Größe des Membranpotentials. Gemäß den Ausführungen von Eisenbach wurde die Verteilung von TPP^+ basierend auf der Akkumulation von $^3\text{H}\text{TPP}^+$ im Proteoliposomenlumen mit Hilfe der Schnell-Filtrations-Methode ermittelt (Eisenbach, 1982, Quick *et al.*, 1996). Die Versuchsansätze setzten sich aus je 400 μL Puffer (siehe 4.5.11.3) versetzt mit 0,1 μM $^3\text{H}\text{TPP}^+$ und 0,2 μM Valinomycin (in EtOH) zusammen. Der Start der Reaktionen erfolgte durch Zugabe von 1 μL LysP-Proteoliposomen (in Puffer 1). Nach Inkubation der Reaktionsansätze bei 25°C wurde das Abstoppen der Reaktionen (nach 0, 2, 5, 15 min) und das unverzügliche Filtrieren der Proteoliposomensuspension durch Cellulose-Acetat-Membranfilter (Sartorius, 1110725N, Porengröße: 0,2 μm) wie in 4.5.10.1 beschrieben ausgeführt.

Basierend auf der Verteilung von $^3\text{H}\text{TPP}^+$ zwischen Proteoliposomenlumen und Reaktionsansatz kann unter Berücksichtigung der Nernst-Gleichung die Größe des korrespondierenden Membranpotentials kalkuliert werden.

4.6 Bioinformatische Methoden

Datenbanken:

EcoCyc:	http://www.ecocyc.org
BsubCyc:	http://www.bsubcyc.org
KEGG:	http://www.genome.jp/kegg/
NCBI:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
RCSB PDB:	http://www.pdb.org
STRING:	string-db.org/
PhotoList:	http://genolist.pasteur.fr/PhotoList/

Aminosäuresequenzvergleiche:

BLAST:	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
KEGG-BLAST:	http://www.genome.jp/tools/blast/
ClustalW2:	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Spidey:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/
GeneDoc:	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/

Topologievorhersage:

TOPCONS:	http://topcons.cbr.su.se/
MEMSAT-SVM:	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/

3D-Strukturvorhersage:

PHYRE ² :	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
----------------------	---

Visualisierung von 3D-Strukturen:

PyMOL:	http://www.pymol.org
--------	---

Western Blot Quantifizierung:

ImageJ:	http://rsb.info.nih.gov/ij/
---------	---

Primerkonstruktion:

Oligo Calc:	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
-------------	---

Klonierungssimulation:

Clone Manager:	http://www.scied.com/index.ht
----------------	---

5 Ergebnisse

5.1 Topologie von LysP aus *E. coli*

5.1.1 In silico Topologievorhersage von LysP

Für die Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden und für die fundierte Diskussion und Einordnung der erhaltenen Resultate war die Analyse und Kenntnis der Topologie von LysP eine Grundvoraussetzung. Frühe Topologiestudien mit *lacZ*- und *blaM*-Fusionen von Ellis *et al.* implizieren eine Sekundärstruktur bestehend aus 12 TM-Helices mit zytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Termini [Abb. A1, blaue Topologie, (Ellis *et al.*, 1995)]. Als Ergänzung für diese experimentelle Bestimmung wurde in der vorliegenden Arbeit eine in silico Vorhersage der Topologie von LysP mittels fünf unterschiedlichen Algorithmen durchgeführt (Abb. A1): SCAMPI-seq (Bernsel *et al.*, 2008), SCAMPI-msa (Bernsel *et al.*, 2008), PRODIV (Viklund & Elofsson, 2004), PRO (Viklund & Elofsson, 2004) und OCTOPUS (Viklund & Elofsson, 2008). Die Integration der erhaltenen putativen Topologien mittels des Programmes TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009) resultierte in einer Konsens-Sekundärstruktur (Abb. A1, magenta Topologie). Alle Algorithmen prognostizierten für LysP eine einheitliche Sekundärstruktur bestehend aus 12 TM-Helices, verbunden durch sechs periplasmatische Schleifen und fünf zytoplasmatische Schleifen, mit ins Zytoplasma ragenden N- und C-terminalen Enden (Abb. A1). Der Vergleich der in silico Vorhersagen mit der Topologie nach Ellis *et al.* zeigte eine Übereinstimmung hinsichtlich der Zahl und der ungefähren Lage der TM-Helices, lediglich die genaue Lage der TM-Domänen variierte teils um einige Aminosäurepositionen [Abb. A1, (Ellis *et al.*, 1995)].

Basierend auf der Strukturvorhersage (Konsens-Topologie) von TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009) wurde zur graphischen Veranschaulichung ein Modell der Sekundärstruktur von LysP erstellt (Abb. 4).

Des Weiteren wurde die Aminosäuresequenz von LysP mit Hilfe des neu entwickelten computergestützten Algorithmus MEMSAT-SVM (Nugent & Jones, 2012) hinsichtlich besonderer struktureller Eigenschaften analysiert. In Analogie zu allen durchgeführten Vorhersagen prognostizierte MEMSAT-SVM ebenfalls 12 TM-Domänen mit ähnlicher Lage bzw. Aminosäurekomposition (Abb. A1, grüne Topologie). Als Charakteristika von LysP ermittelte das Programm MEMSAT-SVM fünf TM-Helices, die möglicherweise an der Bildung des periplasmatisch und zytoplasmatisch zugänglichen Transportkanals beteiligt sind:

Helix 1 (AS22-37), Helix 2 (AS49-75), Helix 3 (AS94-120), Helix 6 (AS202-221) und Helix 8 (AS296-318). Interessanterweise wurden eben diese TM-Helices 1, 3, 6 und 8 anhand von vergleichenden Analysen der Kristallstrukturen und biochemischen funktionalen Charakterisierungen von mehreren Transportproteinen mit ähnlicher Proteinfaltung und Pseudosymmetrie wie der Na⁺/Leucin-Symporter LeuT von *Aquifex aeolicus* [LeuT-Faltung, (Yamashita *et al.*, 2005)] als Transportkanal-bildende TM-Domänen identifiziert, die die Bindung des Substrates (und des Kopplungsions) vermitteln (Abramson & Wright, 2009). Via MEMSAT-SVM wurde die Existenz von einer Transportpore pro LysP-Monomer vorhergesagt.

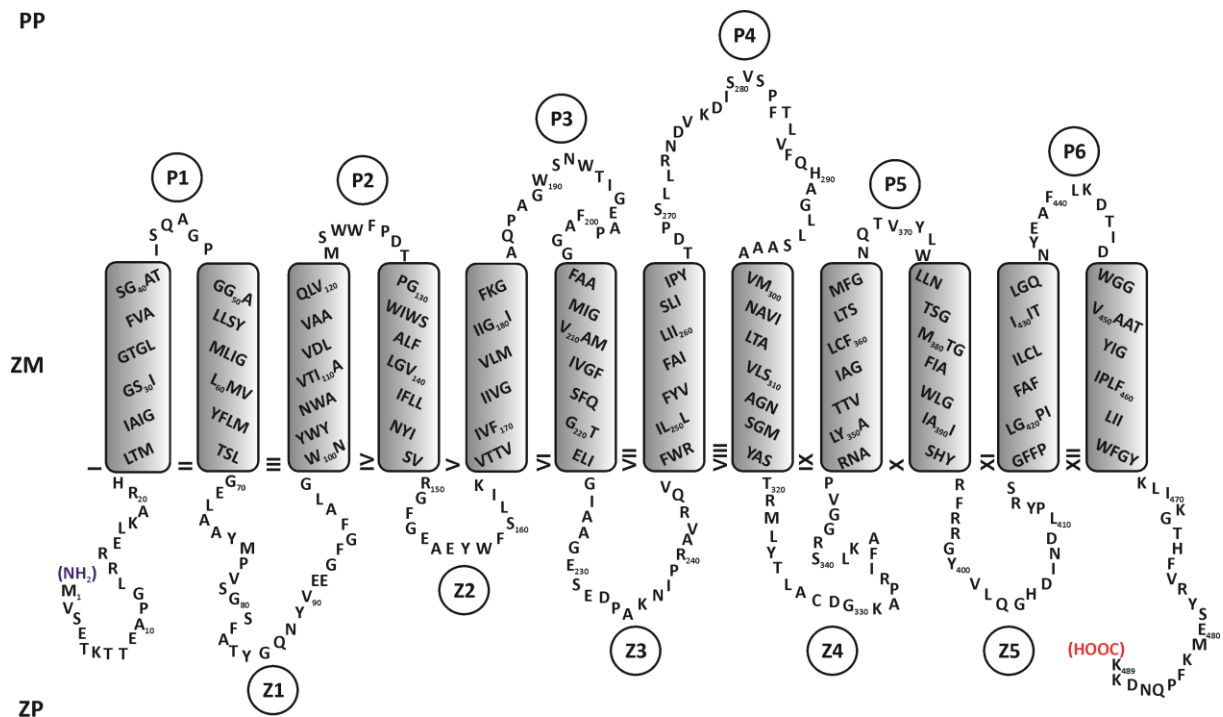


Abb. 4: Topologiemodell von LysP basierend auf der in silico Vorhersage von TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009). Die 12 TM-Domänen sind als Rechtecke dargestellt und nummeriert mit römischen Zahlen I-XII. Verbunden werden die α -helikalen Bereiche durch sechs periplasmatische Schleifen (P1-P6) und durch fünf zytoplasmatische Schleifen (Z1-Z5). N- und C-Terminus sind im Zytoplasma lokalisiert und blau bzw. rot hervorgehoben. NH₂, N-Terminus; COOH, C-Terminus; PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

5.1.2 3D-Strukturvorhersage von LysP

Der PHYRE²-Server [engl. protein homology/analogy recognition engine, (Kelley & Sternberg, 2009)] identifizierte den Na⁺-unabhängigen Aminosäuretransporter ApcT aus *Methanocaldococcus jannaschii* als das am nächsten zu LysP phylogenetisch verwandte Transportprotein mit aufgeklärter Struktur (Shaffer *et al.*, 2009). Als weitere Treffer wurden von PHYRE² der Glutamat/ γ -Aminobuttersäure (GABA)-Antiporter GadC (Ma *et al.*, 2012) und der Arginin/Agmatin-Antiporter AdiC (Gao *et al.*, 2009) aufgeführt. Daher wurde ein 3D-Homologiemodell von LysP (Sequenzbereich: Arg14 bis Lys481) basierend auf der Kristallstruktur (Auflösung: 2,32 Å) von ApcT (PDB (engl. protein data bank): 3GIA) als Matrize mittels dem PHYRE²-Server generiert (Abb. 5). Sowohl LysP, als auch ApcT sind Mitglieder der APC-Transportersuperfamilie (Jack *et al.*, 2000). Beide Proteine gehören allerdings zu verschiedenen Subfamilien [LysP: AAT-Familie, ApcT: ABT (engl. archaeal/bacterial/transporter)-Familie, (Jack *et al.*, 2000)]. Der computergestützte Sequenzvergleich von LysP und ApcT mittels CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007) offenbarte eine Aminosäuresequenzidentität von 20% und eine Sequenzähnlichkeit von 40%.

ApcT weist eine typische LeuT-Proteinfaltung auf, bestehend aus zwei penta-helikalen Wiederholungen mit den pseudosymmetrischen TM-Helices 1-5 und 6-10 (Shaffer *et al.*, 2009). Den inneren Proteinbereich bzw. den Transportkanal bilden die TM-Domänen 1, 3, 6, 8 und 10, umgeben von den Helices 2, 4, 5, 7, 9, 11 und 12 (Shaffer *et al.*, 2009). Die MEMSAT-SVM-Vorhersage von TM-Helices in LysP, die im Zentrum des Transportproteins lokalisiert sind und möglicherweise an der Bildung der Transportpore beteiligt sind (TM-Helix 1, 2, 3, 6 und 8, Abb. A1, grüne Topologie), zeigt somit deutliche Übereinstimmung mit dem LysP-Homologiemodell (Abb. 5C). Bei der Gegenüberstellung des LysP-3D-Modells und der LysP-Struktur nach Ellis *et al.* (Ellis *et al.*, 1995) bzw. den eigenen in silico Prognosen (Abb. A1) wird ersichtlich, dass die Lage der hydrophoben 12 Membransegmente im 3D-Modell trotz geringer Abweichungen im Hinblick auf die jeweilige genaue Aminosäurekomposition deutlich mit den übrigen Sekundärstrukturen übereinstimmt (Abb. A1, orange Topologie). Interessanterweise ist im Falle des LysP-3D-Modells als Charakteristikum von Transportproteinen mit LeuT-Proteinfaltung die Diskontinuität der TM-Helices 1 und 6 erkennbar. Beide TM-Helices setzen sich aus zwei α -helikalen Bereichen zusammen, die ungefähr in der Mitte der Zytoplasmamembran durch ein kurzes ungewundenes Segment verknüpft sind (Abb. A1, orange Topologie).

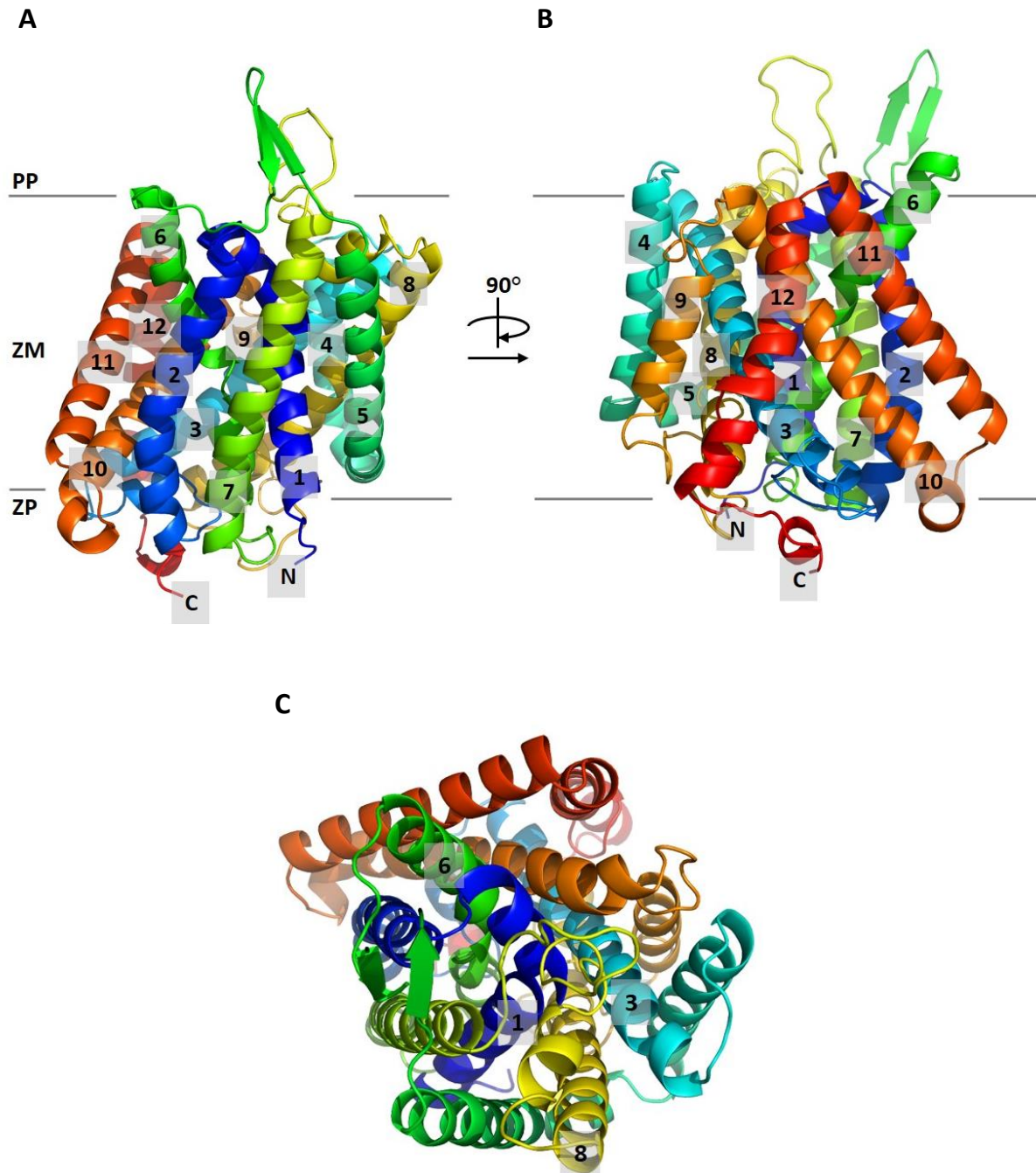


Abb. 5: 3D-Homologiemodell von LysP basierend auf der Kristallstruktur des Na⁺-unabhängigen Aminosäuretransporters ApcT aus *M. jannaschii* (Shaffer *et al.*, 2009). Die Generierung des Homologiemodells erfolgte mittels dem PHYRE²-Server (Kelley & Sternberg, 2009). Die TM-Helices 1-12 sind im Regenbogenfarbverlauf von blau (TM-Helix 1) nach rot (TM-Helix 12) dargestellt und der Reihenfolge nach nummeriert (1-12). A. und B. LysP-Modell in paralleler Ansicht zur Zytoplasmamembran (A) und nach Rotation um 90° (B). C. LysP-Modell aus periplasmatischer Sicht. Nummeriert sind die Transportkanal-säumenden TM-Helices 1, 3, 6 und 8. N, N-Terminus; C, C-Terminus; PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

5.2 In vivo Analyse der Protein-Protein-Interaktion zwischen CadC und LysP

In vitro Quervernetzungsstudien mit gereinigten und rekonstituierten CadC und LysP Proteinen implizieren eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Sensor und Trigger-Transporter (Tetsch *et al.*, 2008). Diese Arbeit fokussierte auf den in vivo Nachweis dieser PPI und auf der Analyse von Stimulus-abhängigen (Lysin, niedriger pH-Wert) Effekten auf diese regulatorische Interaktion. Für diesen Zweck wurde das BACTH-System nach Karimova *et al.*, eine Methode für den Nachweis von PPI's, verwendet (Karimova *et al.*, 1998). Basis dieser Methodik ist die funktionale Interaktions-vermittelte Rekonstitution der Adenylatzyklase (CyaA) von *Bordetella pertussis* in dem *cyaA*-defizienten *E. coli* Stamm BTH101. CyaA besteht aus den zwei komplementären T18- und T25-Untereinheiten, die im Falle physikalischer Separierung enzymatisch inaktiv sind. Fusion von T18 und T25 an miteinander interagierende Polypeptide resultiert in der funktionalen Rekonstitution von CyaA und folglich in der Synthese von zyklischem AMP (engl. cyclic AMP, cAMP, Abb. 6).

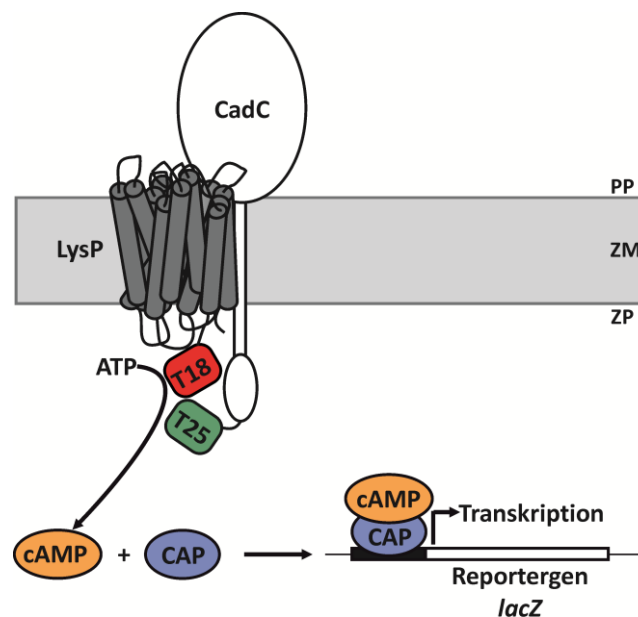


Abb. 6: Prinzip des Bacterial adenylate cyclase two-hybrid-Systems nach Karimova *et al.* am Beispiel von CadC und LysP (Karimova *et al.*, 1998). In diesem Beispiel-Szenario ist das T18-Fragment der Adenylatzyklase (CyaA) von *B. pertussis* N-terminal an LysP fusioniert und die korrespondierende T25-Einheit an den N-Terminus von CadC. Die funktionale Rekonstitution von CyaA bedingt durch physikalische Interaktion der beiden Membranproteine resultiert in der Produktion von cAMP. Nach Bindung von cAMP an CAP induziert der pleiotrope Regulatorkomplex cAMP/CAP die Expression des *lac* Operons. Die quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase dient als Maß für die Interaktionsstärke zwischen den beiden zu analysierenden Proteinen. PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

Nach Bindung von cAMP an CAP (engl. catabolite activator protein) induziert der pleiotrope Regulator-Komplex cAMP/CAP die Expression zahlreicher Gene, eingeschlossen der Gene des *lac* Operons (*lacZYA*). Basierend auf der erhöhten Expression von *lacZ* und der damit verbundenen gesteigerten Enzymaktivität der β -Galaktosidase, kann die Interaktion zwischen zwei Proteinen quantitativ mit Hilfe des chromogenen Farbstoffes oNPG bestimmt werden.

5.2.1 CadC interagiert mit LysP

Um optimale Bedingungen für die Verwendung des BACTH-Systems im Hinblick auf die *in vivo* Analyse der CadC/LysP-PPI zu definieren, wurden die N- und C-terminalen Enden beider Proteine in allen möglichen Kombinationen an die T18- und T25-CyaA-Untereinheiten fusioniert. Da der N- und C-Terminus von LysP ins Zytosol ragen (siehe Abb. 4) wurden vier LysP-Hybridproteine generiert (T18-LysP, LysP-T18, T25-LysP, LysP-T25). Die Topologie von CadC erlaubte ausschließlich die Fusion der CyaA-Fragmente an das N-terminale Ende (T18-CadC, T25-CadC).

Die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten von allen getesteten Kombinationen der Hybridproteine waren im gleichen Bereich wie die Aktivität der Positivkontrolle (Dimerisierung des zytosolischen Transkriptionsfaktors GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae*, Zip), die auf eine starke Interaktion zwischen CadC und LysP unter nicht-Cad-induzierenden Konditionen hindeuteten (Abb. 7, Säulen 1, 4-7). Darüber hinaus war die CadC/LysP-PPI spezifisch: CadC interagiert nicht mit einem anderem sekundären Transporter [YjiY, (Kraxenberger *et al.*, 2012), Abb. 7, Säule 2] und LysP bildete kein Heterooligomer mit einer anderen Membran-verankerten Histidinkinase [YehU, (Kraxenberger *et al.*, 2012), Abb. 7, Säule 3].

Transportstudien mit intakten Zellen demonstrierten, dass die Hybridproteine T18-LysP und LysP-T18 die Aufnahme von Lysin katalysieren konnten und dementsprechend funktional in die Zytoplasmamembran integriert wurden (Abb. 8A). Mittels Western Blot-Analysen mit CadC-spezifischen primären Antikörpern wurde die Produktion und Membraninsertion der beiden Hybridproteine T18-CadC (76 kDa) und T25-CadC (83 kDa) nachgewiesen (Abb. 8B). Es ist anzumerken, dass CadC Wildtyp ein Molekulargewicht von 58 kDa aufweist. Die Bezeichnung der CyaA-Fragmente T18 und T25 beruht auf den entsprechenden molekularen Größen von 18 kDa bzw. 25 kDa.

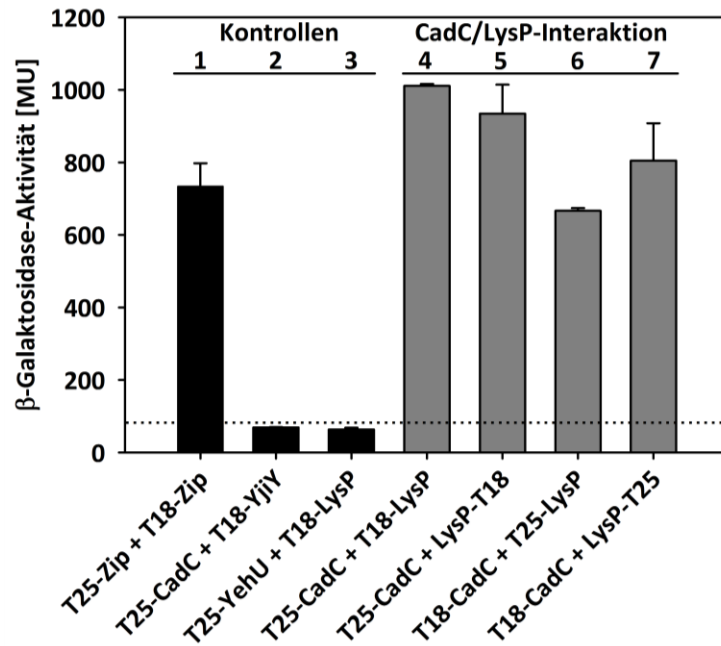


Abb. 7: Quantifizierung der CadC/LysP-Interaktion mit Hilfe des BACTH-Systems. CadC und LysP wurden in allen möglichen Kombinationen an die komplementären T18- und T25-Fragmente der Adenylatzyklase von *B. pertussis* fusioniert. *E. coli* BTH101 wurde mit den Plasmidpaaren, die für die angegebenen Kombinationen von T18- und T25-Hybridproteinen kodieren, co-transformiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium supplementiert mit 0,5 mM IPTG bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5. Die nach Miller bestimmten Aktivitäten des Reporterenzym β -Galaktosidase dienten als Maß für die Interaktionsstärke (Miller, 1992). Die Standardabweichung (Fehlerbalken) errechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten. Die Dimerisierung des Transkriptionsaktivators GCN4 (Zip) diente als Positivkontrolle für PPI (Säule 1). Die Paare T25-CadC/T18-YjiY (Säule 2) und T25-YehU/T18-LysP (Säule 3) fungierten als Spezifitätskontrollen. Die Aktivität von Zellen, die die unfusionierten T18- und T25-Untereinheiten exprimierten, wurde als Interaktions-Schwellenwert (Hintergrundaktivität) definiert und ist gekennzeichnet durch die gepunktete Linie.

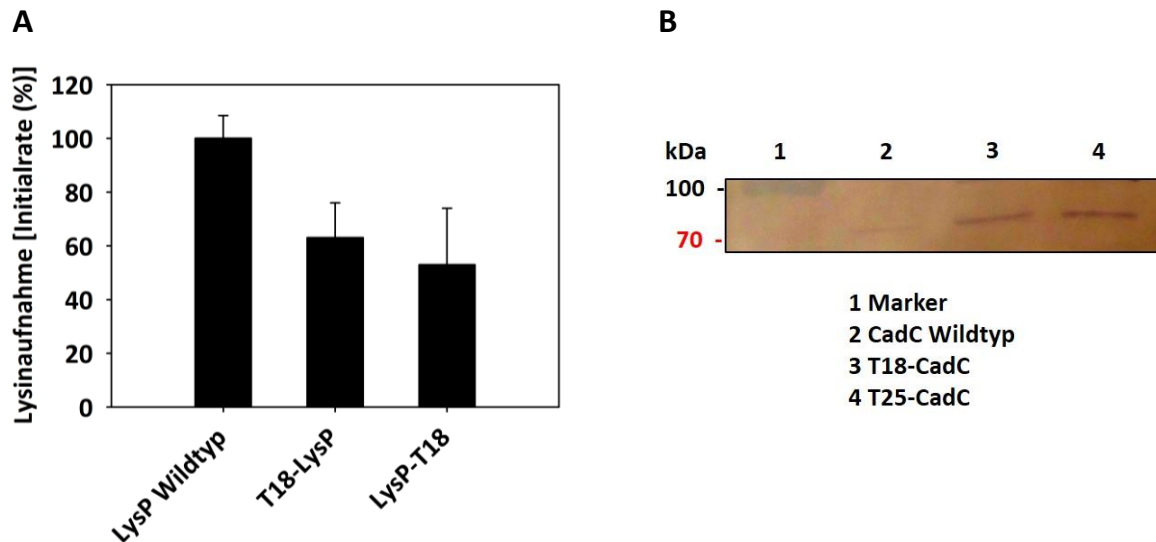


Abb. 8: Funktionalitätskontrolle der CadC- und LysP-BACTH-Fusionsproteine. A. Die Aufnahme von L- $[^{14}\text{C}]$ Lysin (10 μM finale Konzentration) durch *E. coli* JWCD247 ($\Delta argT$, $\Delta cadB$, $\Delta lysP$) wurde nach Komplementation mit pBAD33-*lysP* (LysP Wildtyp) oder pUT18C-*lysP* (T18-LysP) bzw. pUT18-*lysP* (LysP-T18) nach Inkubation mit 20 mM D-Laktat (Na^+ -Salz) als Elektronendonator bei 25°C unter Aerobiose mit Hilfe einer Schnell-Filtrier-Methodik bestimmt. Die Initialraten der Lysinaufnahme sind in Prozent bezogen auf den entsprechenden Wert für LysP Wildtyp [$10,5 \text{ nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$] dargestellt. Die Standardabweichung (Fehlerbalken) errechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten. B. Verifizierung der Produktion und Integration der CadC-Hybridproteine in die Zytoplasmamembran von *E. coli* BL21(DE3) $\Delta cadC$. Dieser Stamm wurde mit Plasmiden transformiert, die für die T18- bzw. T25-CadC-Chimären kodierten. Pro Bande wurden 25 μg an Membranprotein aufgetragen. Primärer Antikörper: Präabsorbierter Rabbit Anti-CadC Antikörper (1:10.000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (1:2500). T18-CadC: ~76 kDa, T25-CadC: ~83 kDa.

5.2.2 Stimulus-abhängige Interaktion zwischen CadC und LysP

Die Aktivierung des Cad-Systems benötigt zwei Stimuli: einen pH-Wert unter 6,8 sensiert durch CadC und extrazelluläres Lysin ($> 0,5 \text{ mM}$) wahrgenommen durch LysP (Fritz *et al.*, 2009). Wie bereits einleitend erwähnt ist die CadC/LysP-Ratio von großer Bedeutung für eine adäquate Stressantwort in Gegenwart von moderatem Säurestress und Lysin (Neely & Olson, 1996, Ude *et al.*, 2013). Die molare Konzentration von LysP ist normalerweise 2-5-fach höher als die Konzentration von CadC [(Ude *et al.*, 2013), siehe 5.6]. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen wurde T18-LysP von einem high-copy Plasmid (pUT18C) und T25-CadC von einem low-copy Vektor (pKT25) exprimiert (Karimova *et al.*, 1998). Der Effekt von Variationen im externen pH-Wert (pH 5,8 vs. pH 7,6) und von variierenden Lysinkonzentrationen (0-128 mM) auf die PPI zwischen diesen beiden Hybridproteinen wurde detailliert in vivo untersucht. Generell kann festgehalten werden, dass die gemessenen

β -Galaktosidase-Aktivitäten unter allen getesteten Bedingungen den Interaktions-Schwellenwert deutlich übertrafen (Abb. 9A).

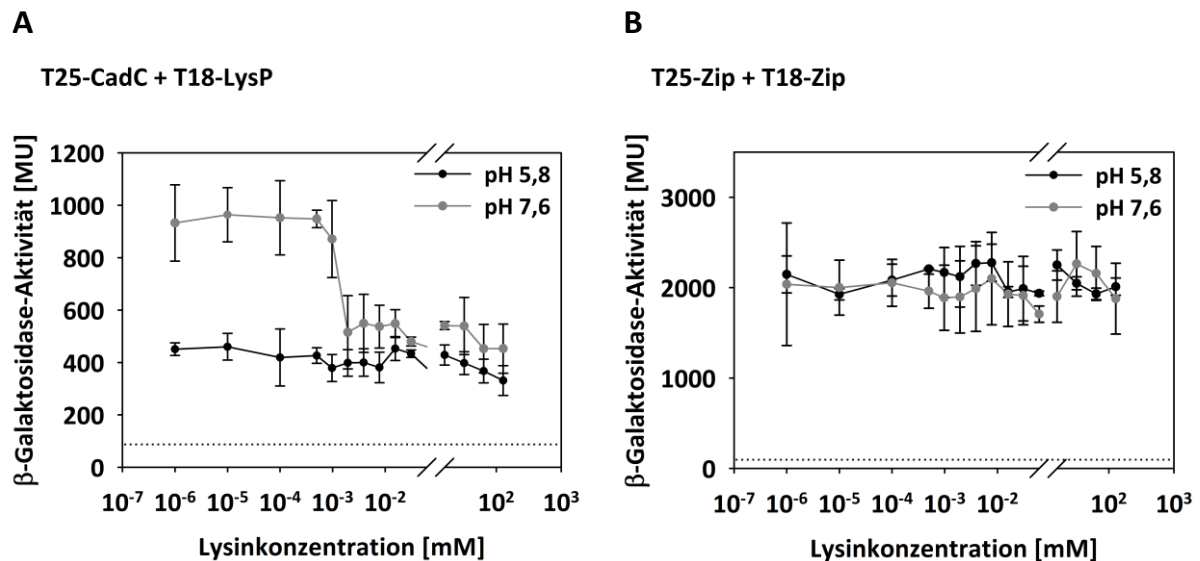


Abb. 9: Effekte von Lysin und pH auf die CadC/LysP-Interaktion (A) und die Zip/Zip-Dimerisierung (B). Die Interaktion der Hybridpaare T25-CadC + T18-LysP (A) und T25-Zip + T18-Zip (B) wurde detaillierter in Abhängigkeit der beiden Cad-Stimuli untersucht. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in KE-Minimalmedium (pH 5,8 und pH 7,6), supplementiert mit variierenden Lysinkonzentrationen (0-128 mM) und 0,5 mM IPTG, unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,5. Die Aktivität des Reporterenzyms β -Galaktosidase wurde als Maß für die Interaktionsstärke bestimmt (Miller, 1992). Der Interaktions-Schwellenwert ist durch die gepunktete Linie gekennzeichnet. Die Standardabweichung (Fehlerbalken) errechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Dieses erstaunliche Resultat deutet auf eine permanente Assoziation von CadC und LysP. Allerdings wurden signifikant höhere β -Galaktosidase-Aktivitäten in Gegenwart von pH 7,6 und Lysinkonzentrationen bis 1 μ M verzeichnet (Abb. 9A, graue Punkte). Diese Beobachtung impliziert eine deutlich stärkere PPI zwischen Sensor und Trigger-Transporter unter nicht-Cad-induzierenden Bedingungen. Interessanterweise setzte ein steiler Abfall der β -Galaktosidase-Aktivitäten bei Lysinlevel von $> 2 \mu$ M (pH 7,6) ein, der auf eine Destabilisierung der CadC/LysP-Interaktion ab dieser Schwellenwert-Konzentration hindeutete (Abb. 9A, graue Punkte). Ähnliche β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden in Gegenwart von pH 5,8 unabhängig von der externen Lysinkonzentration detektiert (Abb. 9A, schwarze Punkte). Die niedrigeren β -Galaktosidase-Aktivitäten bei (i) pH 7,6, Lysinlevel $> 2 \mu$ M und (ii) pH 5,8 belegen eine weniger stabile PPI zwischen CadC und LysP in Gegenwart einer der beiden Cad-Stimuli. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass bereits die Assoziation der beiden T18- und T25-CyaA-Untereinheiten sensitiv ist gegenüber externem

pH-Wert und/oder variierenden Lysinkonzentrationen, wurde die Interaktion der Positivkontroll-Hybridproteine T18-Zip und T25-Zip unter den entsprechenden Konditionen analysiert. Es konnte kein Einfluss von pH und Lysin auf die Assoziation der CyaA- bzw. Zip-Fragmente festgestellt werden (Abb. 9B).

In vivo Experimente und die Integration der in vivo Daten in ein theoretisches mathematisches Modell im Zuge der Studien von Fritz *et al.* zeigten, dass das Cad-Modul in Gegenwart von Lysinkonzentrationen $< 0,5$ mM nicht aktiviert wird, während sehr hohe Lysinlevel > 5 mM zur vollen Aktivierung des Moduls führten (Fritz *et al.*, 2009). Im Hinblick auf diese Lysinkonzentration, benötigt für die CadC-vermittelte Induktion von *cadBA*, offenbart der Vergleich mit dem durch die BACTH-Methodik ermittelten Lysinkonzentration-Schwellenwert (> 2 μ M) für die Attenuation der CadC/LysP-Interaktion eine signifikante Diskrepanz zwischen den entsprechenden Lysinleveln. Die den Dosis-Antwort-Kurven von Fritz *et al.* zugrundeliegenden in vivo-Analysen (Bestimmung der CadA-Aktivität) wurden mit dem Wildtyp *E. coli* Stamm MG1655 durchgeführt (Fritz *et al.*, 2009). Um den Effekt von sehr niedrigen Lysinkonzentrationen (μ M-Bereich) auf das Cad-System zu untersuchen, wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit der *cadBA* Expression von der externen Lysinkonzentration (0-128 mM) in Gegenwart von pH 5,8 unter Verwendung des neu konstruierten und sensitiveren *E. coli* Reporterstammes MG-CR [$\Delta cadBA$, *cadBA::lacZ*, (Ruiz *et al.*, 2011)] untersucht. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten als Maß für die Expression von *cadBA* machte deutlich, dass die Cad-Zielgene bereits ab einem Lysin-Schwellenwert von $0,125$ mM exprimiert werden (Abb. 10). Übereinstimmend mit den Daten von Fritz *et al.* wurde eine volle Induktion von *cadBA* ab einem Lysinlevel zwischen 4-8 mM verzeichnet [Abb. 10, (Fritz *et al.*, 2009)] . Ebenso konnte die *cadBA* Expression nicht durch höhere Lysinkonzentrationen (> 8 mM) gesteigert werden (Abb. 10). Es kann festgehalten werden, dass die (beginnende) Aktivierung des Cad-Moduls 63 mal mehr Lysin benötigt als die beobachtete Destabilisierung der CadC/LysP-PPI. Geht man im Falle des CadC/LysP-Paares davon aus, dass die experimentell bestätigte Attenuation der PPI ab Lysinlevel > 2 μ M die Transduktion des Lysinsignals von Co-Sensor zu Sensor repräsentiert, so konnte leider diese Lücke im Verständnis der Lysin-Co-Sensorik hinsichtlich der Diskrepanz der Lysin-Schwellenwerte nicht durch in vivo Reporteranalysen mit *E. coli* MG-CR und in vivo BACTH-Studien gefüllt werden.

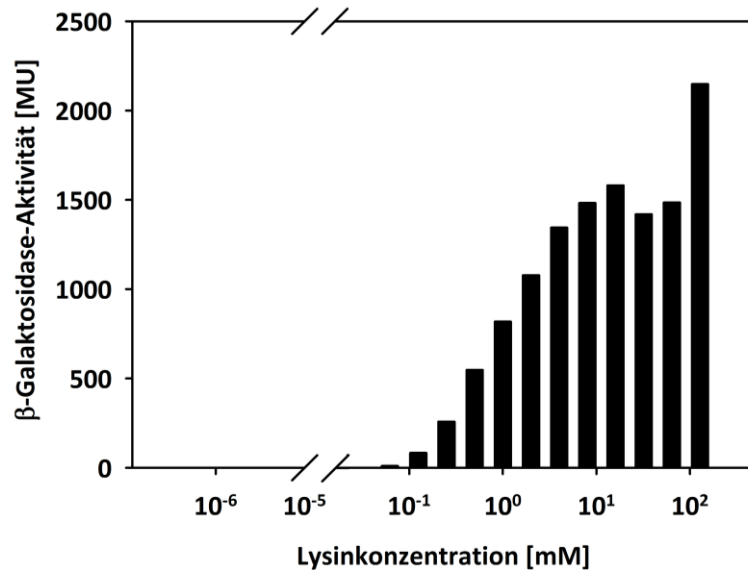


Abb. 10: Abhängigkeit der *cadBA* Expression von der externen Lysinkonzentration. *E. coli* MG-CR ($\Delta cadBA$, *cadBA::lacZ*) wurde in KE-Minimalmedium (pH 5,8) unter Mikroaerobiose in Gegenwart von steigenden Lysinkonzentrationen (0-128 mM) bis OD₆₀₀ ~0,3-0,5 kultiviert. Die bestimmten β -Galaktosidase-Aktivitäten dienen als Maß für die Expression von *cadBA*. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

5.2.3 Identifikation von Positionen/Domänen in CadC involviert in die Interaktion mit LysP

Für den *in vivo* Nachweis des Einflusses von CadC-Varianten auf die Interaktion mit LysP und für das Screening von weiteren Positionen/Domänen in CadC, die in die CadC/LysP-PPI involviert sind, wurde erneut die *in vivo* BACTH-Methode angewandt. Zunächst wurden CadC-Varianten, die im Zuge früherer Mutagenese- und *in vivo* Expressionsstudien identifiziert wurden und einen Lysin-unabhängigen Phänotyp bedingten, nach N-terminaler Fusion an T25 hinsichtlich der physikalischen Interaktion mit dem Hybridprotein T18-LysP analysiert (Abb. 11A). Es muss angemerkt werden, dass alle ausgewählten CadC-Varianten bei *in vivo* Funktionalitätstests keine Defekte in der Sensierung des externen pH-Wertes und korrekte Membran-Topologie aufwiesen [(Tetsch & Jung, 2009b, Tetsch *et al.*, 2011); L. Tetsch, unveröffentlichte Daten; S. Buchner, unveröffentlichte Daten].

Die bestimmten β -Galaktosidase-Aktivitäten für die CadC- Δ F159-F165/LysP und CadC-F165A/LysP Hybridprotein-Kombinationen lagen unter dem Interaktions-Schwellenwert (Abb. 11B, Säulen 3 und 4) und deuteten auf eine effektive Prävention der Interaktion. Im Zuge eines detaillierten Transposonmutageneseansatzes für die Kartierung von CadC zur Aufklärung des zugrundeliegenden Signaltransduktions-Mechanismus über die Zytoplasmamembran wurde u. a. das Pentapeptid RPQLV zwischen die Positionen Val176

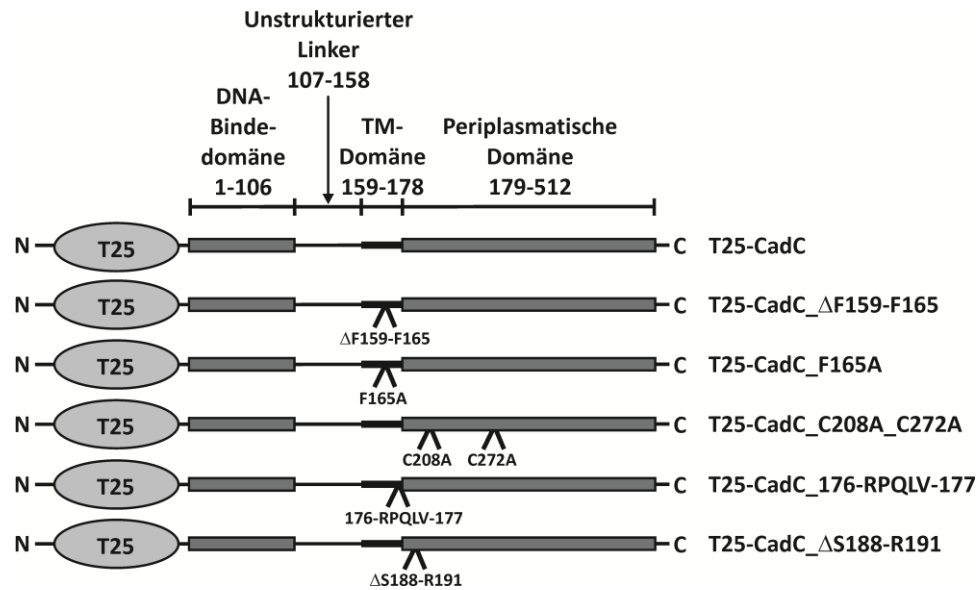
und Ala177 in der TM-Helix des pH-Sensors inseriert (S. Buchner, unveröffentlichte Daten). Die Insertion dieses Pentapeptides resultierte in einem Verlust der PPI mit LysP (Abb. 11B, Säule 6). Diese Beobachtungen bekräftigten die Wichtigkeit eines aromatischen Clusters in der TM-Domäne, spezifisch von Phe165, sowie der strukturellen Integrität der TM-Helix von CadC für die Heterooligomerisierung mit LysP.

Die Kombination CadC-C208A_C272A/LysP produzierte β -Galaktosidase-Aktivitäten, die ungefähr 2-fach höher ausgeprägt waren als die Schwellenwert-Aktivität (Abb. 11B, Säule 5). Demnach bedingte semiaktives CadC (Tetsch *et al.*, 2011) durch die Unterbindung der Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke (C208-C272) in CadC_{PD} via Aminosäure-Substitutionen eine schwächere Interaktion mit LysP.

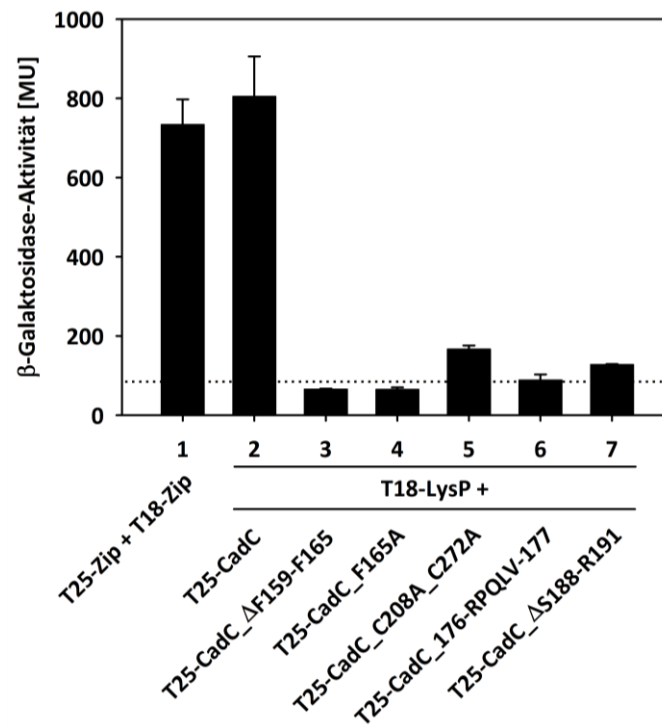
Dem positiv geladenen Motiv Ser188_Lys189_Ser190_Arg191 (SKSR-Motiv) am Übergang von der TM-Domäne zur Subdomäne 1 von CadC_{PD} wurde eine potentielle Funktion bei der pH- oder Lysin-abhängigen CadC-vermittelten Signaltransduktion (z. B. bei der postulierten pH-abhängigen Homooligomerisierung des Sensors oder der Heterooligomerisierung mit LysP) zugesprochen. Die Deletion des SKSR-Motives (Δ S188-R191) hatte keinen Effekt auf die pH-abhängige Transkriptionsaktivierung von *cadBA*, während die Expression der Zielgene unabhängig von Lysin induziert wurde (L. Tetsch, unveröffentlichte Daten). Diese Destabilisierung der PPI mit LysP wurde mit Hilfe der vorliegenden BACTH-Studie bestätigt, da die Deletion von SKSR ungefähr 1,4-fach erhöhte β -Galaktosidase-Aktivitäten im Vergleich zu den Schwellenwert-Aktivitäten produzierte (Abb. 11B, Säule 7). Die Rolle des SKSR-Motives bei der Lysin-abhängigen Regulation von CadC ist derzeit noch unklar, aber die Funktion als direkte Kontaktstelle an der Grenzfläche des Heterooligomers kann ausgeschlossen werden, da der zielgerichtete Austausch von SKSR durch verschiedene Aminosäure-Kombinationen (AAAA, AQAQ, SQSQ) keine Defekte in der pH- und Lysin-abhängigen Induktion von *cadBA* generierte (L. Tetsch, unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mittels BACTH-Analysen die bereits postulierte Destabilisierung der Interaktion mit LysP im Hintergrund aller getesteten CadC-Varianten im Rahmen dieser Arbeit in vivo nachgewiesen werden konnte. Dabei ist der Verlust oder die Abschwächung der Interaktion eindeutig auf die entsprechenden Aminosäure-Substitutionen, -Deletionen und -Insertionen in CadC zurückzuführen, da alle T25-CadC-Varianten produziert und in die Zytoplasmamembran inseriert wurden (Abb. 11C).

A



B



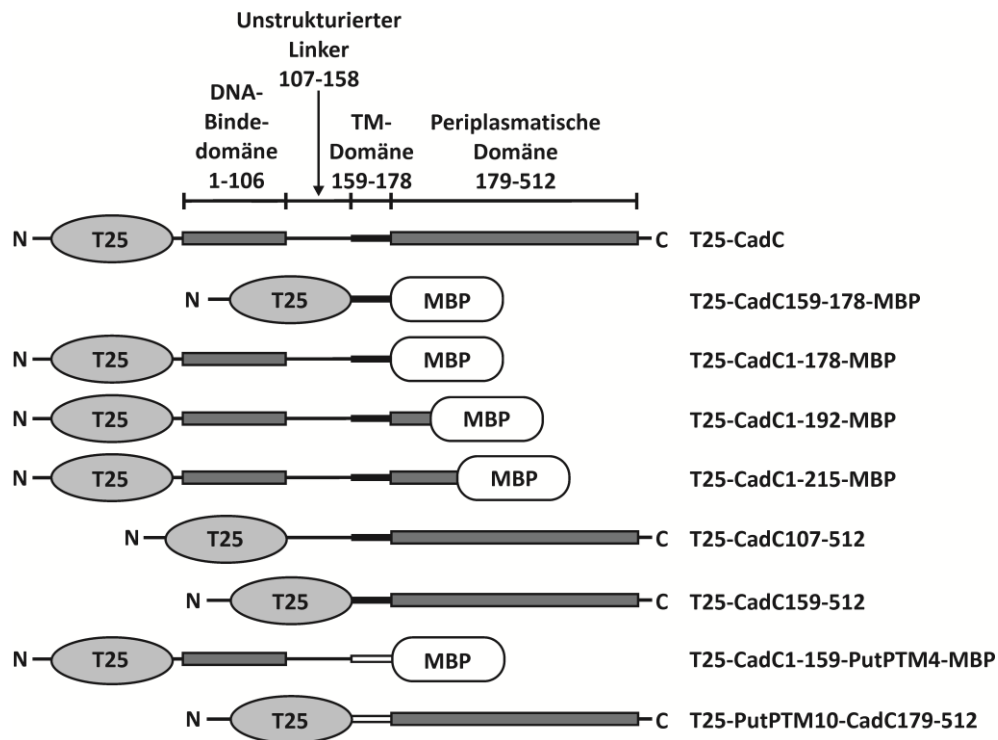
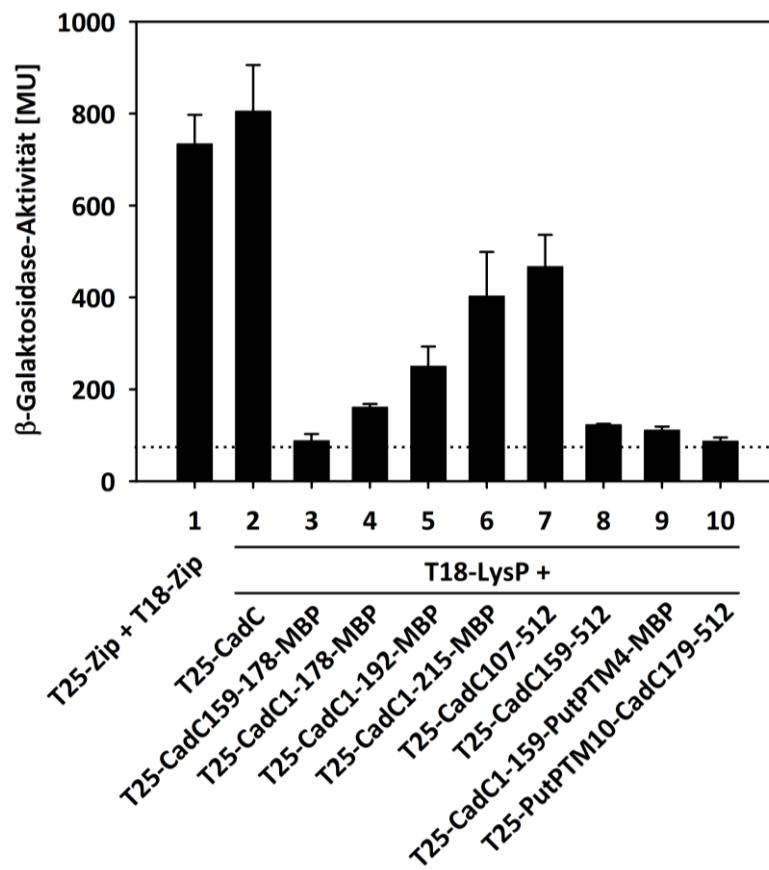
C



Abb. 11: Einfluss von CadC-Varianten, charakterisiert durch Defekte in der LysP-vermittelten Lysin-abhängigen Regulation, auf die Interaktion mit der Lysinpermease. A. Schematische Repräsentation der Architektur der T25-CadC-Varianten, die hinsichtlich der Interaktion mit T18-LysP getestet wurden. B. Reporter-gen-Analysen wurden nach Co-Transformation des *E. coli* Stammes BTH101 mit Plasmidpaaren, kodierend für T18-LysP und den angegebenen T25-CadC-Varianten, in Analogie zur detaillierten Beschreibung in Legende von Abb. 7 durchgeführt. C. Immunologischer Nachweis der Biosynthese und Membranintegration der analysierten CadC-Varianten (siehe Legende von Abb. 8B).

Für die Kartierung von zusätzlichen Interaktionspositionen und -domänen in CadC wurde ein Set an CadC-Chimären mit unterschiedlicher Aminosäuren- und Domänenkomposition konstruiert (Abb. 12A) und im Hinblick auf die PPI mit T18-LysP untersucht (Abb. 12B). Alle verkürzten CadC-Chimären, die über keine bzw. keine komplette periplasmatische Domäne verfügten, wurden C-terminal an *malE* ohne Signalpeptid (MBP) fusioniert, um eine korrekte Membrantopologie zu gewährleisten (Abb. 12A). Darüber hinaus diente MBP als Membrantopologie-Indikator, da die Biosynthese und Membranintegration jeder Chimäre auf einfache Weise durch Screening nach Komplementation des MBP-defizienten *E. coli* Stammes MM39 verifiziert werden konnte. Das Wachstum dieses Stammes mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle ist nur möglich, wenn der MBP-Part der zu analysierenden Chimären im Periplasma lokalisiert ist (Jung *et al.*, 2007). Basierend auf diesem Wachstumstest konnte gezeigt werden, dass alle MBP-Chimären korrekte Membrantopologie aufwiesen (Abb. 12C). Die Produktion und Integration der Chimären T25-CadC159-512 (~65 kDa), T25-CadC-PutPTM10-CadC179-512 (~65 kDa) sowie T25-CadC107-512 (~71 kDa) wurde mittels Western Blot-Analysen mit CadC-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 12D).

Da im Zuge von in vivo Reportergeräten- (Tetsch *et al.*, 2008) und Interaktionsanalysen (diese Arbeit) bereits die TM-Helix (spezifisch Phe165) von CadC als potentielle Interaktionsdomäne identifiziert wurde, wurde die separierte TM-Helix von CadC (T25-CadC159-178-MBP) hinsichtlich der Interaktion mit LysP untersucht. Interessanterweise deutete die fehlende Interaktion auf die Beteiligung von zusätzlichen Positionen/Domänen in CadC bei der Generierung und/oder Stabilisierung der Assoziation mit LysP (Abb. 12B, Säule 3). Die Paare (i) T18-LysP/T25-CadC1-159-PutPTM4-MBP und (ii) T18-LysP/T25-PutPTM10-CadC179-512, wobei (i) ausschließlich die zytoplasmatische (CadC_{ZD}) und (ii) die periplasmatische Domäne von CadC umfasste, produzierten ebenfalls sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivitäten im Bereich der Hintergrundaktivität (Abb. 12B, Säule 9 und 10). Die Membranverankerung dieser beiden Chimären wurde durch Fusion der entsprechenden CadC-Domäne an separierte Helices (TM4 und TM10) des Na⁺/Prolin-Symporters PutP von *E. coli* erzielt (Jung, 1998). Allerdings kann nicht eindeutig aus diesem Resultat abgeleitet werden, dass weder CadC_{ZD}, noch CadC_{PD} allein in der Lage sind, eine Heterooligomerisierung mit LysP zu vermitteln, da bereits Domänen-Austausch-Experimente, bei denen die TM-Domäne von Volllängen-CadC mit einer TM-Helix von PutP ersetzt wurde, einen Lysin-unabhängigen Phänotyp bedingten (Tetsch *et al.*, 2008).

A**B**

C

Stamm	CadC-Chimäre	Wachstum auf eM9 Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose als C-Quelle
MG1655 (Wildtyp)		✓
MM39 ($\Delta malE$)		x
MM39 ($\Delta malE$)	T25-CadC159-178-MBP	✓
MM39 ($\Delta malE$)	T25-CadC1-178-MBP	✓
MM39 ($\Delta malE$)	T25-CadC1-192-MBP	✓
MM39 ($\Delta malE$)	T25-CadC1-215-MBP	✓
MM39 ($\Delta malE$)	T25-CadC1-159-PutPTM4-MBP	✓

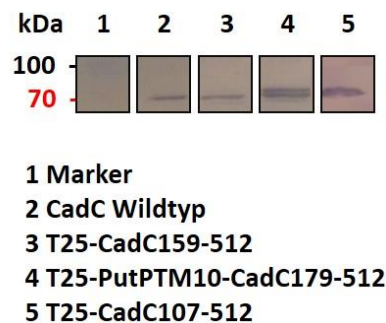
D

Abb. 12: Kartierung von Positionen/Domänen in CadC, die an der Heterooligomerisierung mit LysP partizipieren. A. Schematische Repräsentation der Architektur der T25-CadC-Chimären unterschiedlicher Aminosäuren- und Domänenkomposition, die hinsichtlich der Interaktion mit T18-LysP getestet wurden. B. Reporter-Gen-Analysen wurden nach Co-Transformation des *E. coli* Stammes BTH101 mit Plasmidpaaren, kodierend für T18-LysP und die angegebenen T25-CadC-Chimären, in Analogie zur detaillierten Beschreibung in Legende von Abb. 7 durchgeführt. C. Kontrolle der Biosynthese und Membraninsertion der MBP-CadC-Chimären. Der *malE*-defiziente *E. coli* Stamm MM39 wurde mit den aufgelisteten Plasmid-kodierten MBP-CadC-Chimären transformiert und hinsichtlich des Wachstums auf eM9-Minimalmedium-Agarplatten mit Maltose als einziger C-Quelle kontrolliert. Dabei diente *E. coli* MG1655 (Wildtyp) als Positivkontrolle. D. Immunologischer Nachweis der Produktion und Membranintegration der CadC-Chimären T25-CadC159-512, T25-PutPTM10-CadC179-512 und T25-CadC107-512 (siehe Legende von Abb. 8B).

Folglich kann ausschließlich das Fehlen der CadC-TM-Domäne im Falle beider Chimären der Grund für das Ausbleiben der Interaktion mit LysP sein. Diese Vermutung ist konsistent mit der Beobachtung, dass das Paar bestehend aus T18-LysP und einer CadC-Variante, zusammengesetzt aus CadC_{ZD} und der CadC-TM-Domäne (T25-CadC1-178-MBP) β -Galaktosidase-Aktivitäten erzeugte, die 2-fach höher waren als die Hintergrundaktivität und demnach eine schwache Interaktion andeuteten (Abb. 12B, Säule 4). Die Extension von

CadC1-178 mit Aminosäureresten, die in der periplasmatischen Sensordomäne lokalisiert sind (T25-CadC1-192-MBP, T25-CadC1-215-MBP), erhöhten sukzessive die β -Galaktosidase-Aktivitäten (Abb. 12B, Säule 5 und 6). Ein weiterer Anstieg der Interaktionsstärke wurde bei der CadC-Chimäre beobachtet, die aus der unstrukturierten Linkerregion, der TM-Domäne und der kompletten periplasmatischen Domäne aufgebaut war (T25-CadC107-512, Abb. 12B, Säule 7). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neben der TM-Helix, Aminosäuren in der periplasmatischen Sensordomäne von CadC eine wichtige Rolle bei der Vermittlung und/oder Stabilisierung der CadC/LysP-Heterooligomerisierung spielen. Unerwarteterweise produzierte das Paar T18-LysP/T25-CadC159-512 sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivitäten ähnlich des Interaktions-Schwellenwertes (Abb. 12B, Säule 8). Diese fehlende Interaktion trotz des positiven Nachweises der Integration in die Zytoplasmamembran (Abb. 12D) kann auf Membranassoziation auf zytoplasmatischer Seite anstatt Membraninsertion der CadC-Chimäre zurückzuführen sein. Mittels Western Blot-Analyse der Membranfraktion von *E. coli* BL21(DE) $\Delta cadC$ nach Überproduktion von T25-CadC159-512 konnte nicht zwischen membranöser Assoziation oder transmembraner Verankerung differenziert werden.

5.2.4 Stimulus-abhängige Homooligomerisierung von LysP

Zahlreiche Transportproteine bilden Homooligomere. Allerdings ist in den meisten Fällen die funktionale und/oder strukturelle Bedeutung der oligomeren Komplexe nicht bekannt, aber die Modulation der Quartärstruktur scheint oft in die Regulation der Transportaktivität involviert zu sein (Veenhoff *et al.*, 2002). Daher wurden alle LysP BACTH-Kombinationen (T18-LysP, LysP-T18, T25-LysP, LysP-T25) hinsichtlich der Oligomerisierung analysiert. Die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten implizieren eine Homooligomerisierung von LysP (Abb. 13A, Säulen 3-6). Die Bildung von Homooligomeren ist eine spezifische Eigenschaft von LysP, da die Lysinpermease keine oligomeren Komplexe mit einem anderen Transportprotein bildete (YjiY, (Kraxenberger *et al.*, 2012), Abb. 13A, Säule 2). Durch in vivo Transportassays wurde die Funktionalität von T18-LysP und LysP-T18 nachgewiesen, da beide Hybride die Aufnahme von Lysin in *E. coli* JWCD247 katalysierten (siehe Abb. 8A). Im Hinblick auf die Funktion von LysP als Lysin-Co-Sensor im Rahmen des Cad-Säureresistenzsystems wurde der Effekt von verschiedenen pH-Werten und Lysinkonzentrationen auf die LysP-Oligomerisierung des Paares T18-LysP und T25-LysP untersucht. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten, die bei pH 7,6 bestimmt wurden, waren 2-3-fach höher als der Interaktions-Schwellenwert und deuten demnach auf eine schwache Interaktion von LysP-Monomeren in Gegenwart von physiologischem pH (Abb. 13B, graue Punkte). Bei

Exponierung der Bakterienzellen gegenüber niedrigem pH (5,8) wurde die Oligomerisierung von LysP signifikant erhöht, während steigende Lysinkonzentrationen (0-128 mM) keinen Effekt auf die Interaktion von T18-LysP und T25-LysP hatten (Abb. 13B, schwarze Punkte). Leider konnte basierend auf der binären Natur des BACTH-Systems nicht die Anzahl an LysP-Monomeren bestimmt werden, die an der pH-abhängigen Bildung von homooligomeren Komplexen beteiligt sind.

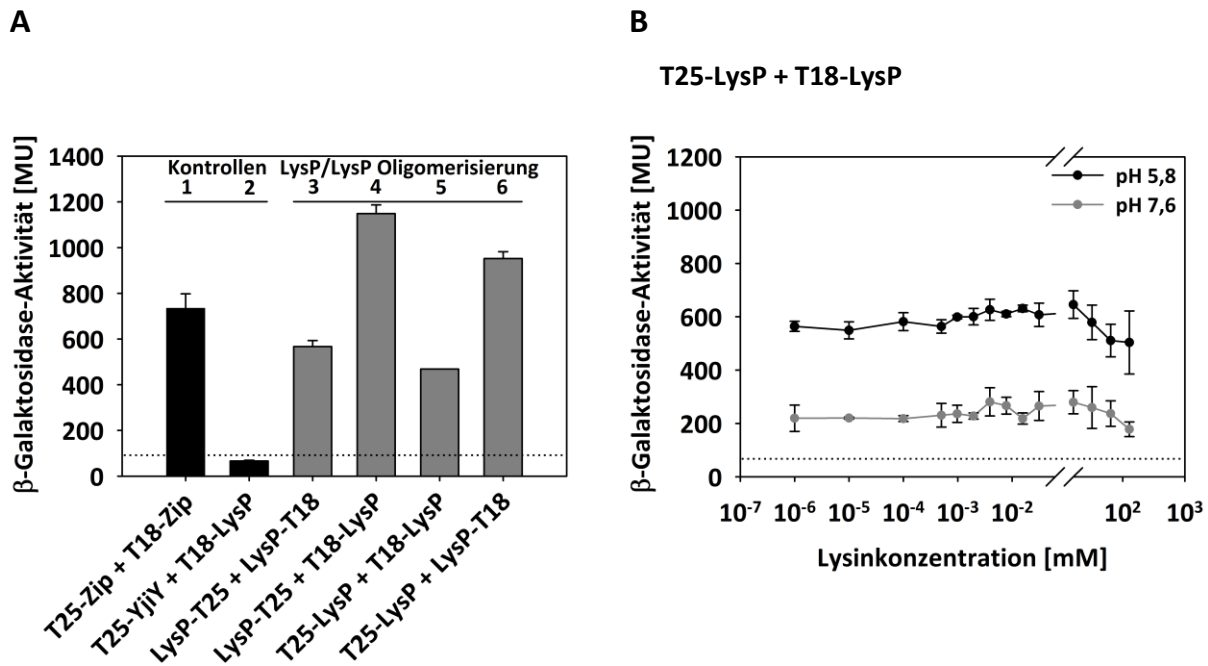


Abb. 13: Quantifizierung der LysP/LysP-Oligomerisierung unter Verwendung des BACTH-Systems. A. LysP wurde in allen möglichen Kombinationen an die komplementären T18- und T25-Fragmente der Adenylatzyklase von *B. pertussis* fusioniert. *E. coli* BTH101 wurde mit den Plasmidpaaren, die für die angegebenen Kombinationen von T18- und T25-Hybridproteinen kodieren, co-transformiert. Reporteranalysen wurden analog zur Beschreibung in Legende von Abb. 7 durchgeführt. Das Paar T25-YjiY/T18-LysP (Säule 2) fungierte als Spezifitätskontrolle. B. Effekte von Lysin und pH auf die LysP/LysP-Homooligomerisierung. Die Ausführung der Reporteranalyse erfolgte wie in Legende zu Abb. 9 detailliert beschrieben.

5.2.5 Homooligomerisierung von CadC

Mehrere experimentelle Befunde deuten darauf, dass die Dimerisierung von CadC eine Rolle bei der Transkriptionsaktivierung von *cadBA* spielt: (i) im P_{cadBA} Promotor wurden zwei CadC-Bindestellen (CAD1 und CAD2) identifiziert (Küper & Jung, 2005) und (ii) Kristallisation und Strukturanalysen von CadC_{PD} deckten die Existenz von Dimeren der CadC-Sensordomäne auf (Eichinger *et al.*, 2011). Es wird postuliert, dass bei Säurestress die

Protonierung von negativ geladenen Aminosäuren der CadC_{PD} zu einer Veränderung der Position der beiden CadC-Monomere zueinander innerhalb eines funktionalen Dimers führt (Haneburger *et al.*, 2011). Leider ist diese Signal-abhängige Modulation des oligomeren Komplexes sehr schwer experimentell zu untersuchen, da CadC in der Zelle in sehr geringer Kopienzahl [3-5 Moleküle/Zelle, (Ude *et al.*, 2013)] vorliegt. Um weitere Einblicke in die pH- und/oder Lysin-regulierte Homooligomerisierung von CadC zu bekommen, wurde die pH- und Lysin-Abhängigkeit der Interaktion des Hybridpaares T25-CadC und T18-CadC mittels BACTH untersucht. Die sehr hohen bestimmten β -Galaktosidase-Aktivitäten implizieren eine persistente Oligomerisierung von CadC unabhängig von den beiden Cad-Stimuli (Abb. 14). Basierend auf dieser Beobachtung scheint die Signaltransduktion durch subtile Positionsveränderungen der CadC-Monomere innerhalb des persistenten Homooligomers vermittelt zu werden.

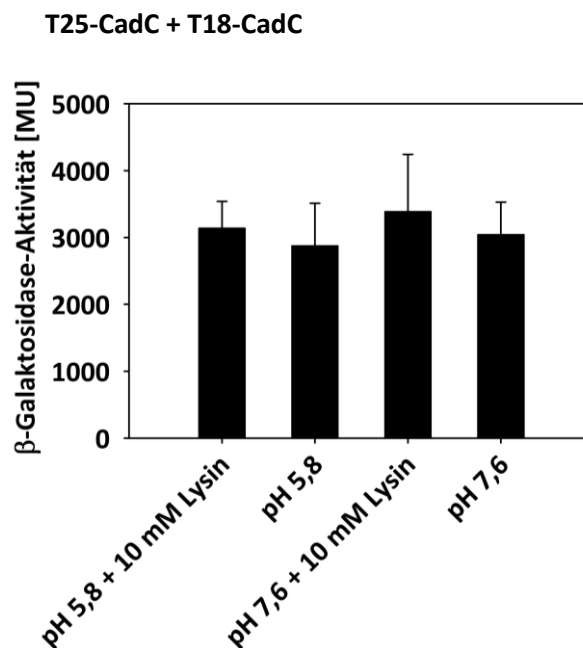


Abb. 14: Effekte von Lysin und pH auf die CadC/CadC-Homooligomerisierung. *E. coli* BTH101 wurde mit dem Plasmidpaar T25-CadC/T18-CadC co-transformiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in KE-Minimalmedium (pH 5,8 und pH 7,6), mit und ohne Supplementation von 10 mM Lysin und 0,5 mM IPTG, unter mikraeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5. Die gepunktete Linie repräsentiert den Interaktionsschwellenwert (unfusionsierte T18- und T25-Fragmente). Die Standardabweichung errechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten.

5.3 Identifikation von Positionen in LysP essentiell für die Lysin-abhängige Regulation von CadC

5.3.1 Ungerichtete Mutagenese von *lysP*

Für die Analyse der funktionalen Kopplung beider Funktionen, Transport und Regulation, des Trigger-Transporters LysP und für die Identifikation von Aminosäuren, die als Kontaktstellen an der Interaktion mit CadC beteiligt sind, wurde *lysP* anfänglich durch ungerichtete Mutagenese modifiziert (Diplomarbeit B. Weckerlein, 2010). Dabei wurden drei unterschiedliche Methoden eingesetzt: (i) in vitro chemische Mutagenese mit Hydroxylaminhydrochlorid [C→T- und G→A-Transitionen, (Rimon *et al.*, 1995)], (ii) Verwendung des Mutagenese-Stammes *E. coli* XL1-Red, der Defekte in den drei elementaren DNA-Reparatursystemen aufweist (Greener *et al.*, 1997) und (iii) in vitro PCR-Mutagenese mit limitiertem dATP (Kuipers, 1996) und Zusatz von MnCl₂ und β-Mercaptoethanol. Ein colorimetrischer blau-weiß Test mit dem chromogenen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) ermöglichte das Screening nach Mutationen in *lysP*, die eine Lysin-unabhängige Expression von *cadBA* hervorriefen und folglich durch Defekte in der Regulation von CadC und/oder durch Verlust der Fähigkeit mit CadC zu interagieren charakterisiert waren (Weckerlein, 2010).

Allerdings wurden mittels ungerichteter Mutagenese fast ausschließlich falsch-positive Klone identifiziert, die nach darauffolgendem zielgerichtetem Austausch der entsprechenden Aminosäurepositionen im Zuge von in vivo Reportergermanalysen mit *E. coli* EPCD4 keine Defekte in der Regulation von CadC aufwiesen (Tab. 5). Die einzigen drei Varianten, die nach zielgerichteter Substitution noch einen Lysin-unabhängigen Phänotyp bedingten, waren LysP-A297T, -A318E und -W373R. Leider war im Falle von LysP-A297T und -W373R der Defekt in der Lysin-abhängigen Regulation von CadC auf die fehlende Biosynthese der Varianten zurückzuführen (Tab. 5). Die detaillierte Analyse der Position Ala318 durch weitere zielgerichtete Austausche (LysP-A318E/D/V/L) implizierte, dass die gestörte Lysin-Co-Sensorik nicht auf der Mutationsposition (Ala318) per se beruhte, sondern auf der Insertion von geladenen (LysP-A318E/D) und länger-kettigen (LysP-A318L) Aminosäuren in hydrophobe Proteinbereiche basierte, die möglicherweise in weitreichenden konformationellen Änderungen des Transporters resultierten (Tab. 5).

Da mittels des initialen ungerichteten Mutageneseansatzes lediglich falsch-positive Klone oder sehr artifizielle Insertionen generiert wurden, erfolgte die weitere Suche nach möglichen

Interaktionspositionen durch zielgerichtete Mutagenese von spezifisch ausgewählten Aminosäureresten in LysP (siehe 5.3.2).

Tab. 5: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in LysP auf die Lysin-abhängige Regulation der CadC-vermittelten *cadBA* Expression und auf die Lysintransportaktivität. Die Aminosäurepositionen wurden via ungerichteter Mutagenese identifiziert und dann anschließend erneut zielgerichtet substituiert. Reportergenanalysen wurden mit *E. coli* EPCD4 nach Co-Transformation mit pET16b-*cadC2* und pBAD33-*lysP* oder den aufgelisteten LysP-Varianten durchgeführt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte unter Mikroaerobiose bei 37°C in KE-Minimalmedium (pH 5,8 ohne oder mit 10 mM Lysin) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5. Die bestimmten β -Galaktosidase-Aktivitäten (Miller, 1992) dienen als Maß für die *cadBA* Expression. Die Standardabweichung des Durchschnittswertes errechnet sich aus drei unabhängig ausgeführten Experimenten. Die Aufnahme von L-[¹⁴C]Lysin (finale Endkonzentration: 10 μ M) durch *E. coli* JWCD247 nach Komplementation mit pBAD33-*lysP* oder den aufgelisteten LysP-Varianten wurde in Gegenwart von 20 mM D-Laktat (Na⁺-Salz) als Elektronendonator bei 25°C unter aeroben Bedingungen unter der Verwendung einer Schnell-Filtrations-Methode bestimmt. Die Initialraten sind in Prozent bezogen auf den Durchschnittswert von Wildtyp LysP [10,5 nmol*(min*mg Protein)⁻¹] angegeben. Mit Ausnahme von Wildtyp LysP und der Kontrolle (Dreifachbestimmung) sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung angegeben. Die Produktion und Integration der LysP-Varianten in die Zytoplasmamembran von *E. coli* EPCD4 wurde mittels Western Blot-Analysen untersucht. Primärer Antikörper: Penta-His-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000). ✓, Membranintegration; ×, keine Membranintegration.

LysP-Varianten	β -Galaktosidase-Aktivität [MU]		Lysintransport Initialrate (%)	Membran- integration
	pH 5,8 + 10 mM Lysin	pH 5,8 ohne Lysin		
LysP Wildtyp	269 \pm 23	7 \pm 4	100 \pm 9	✓
Kein LysP	258 \pm 39	214 \pm 29	2 \pm 0,3	×
S44F	400 \pm 0,1	10 \pm 1	156	✓
I147F ¹	406 \pm 34	1 \pm 1	89	✓
Y157L ²	391 \pm 5	3 \pm 1	28	✓
R243N ¹	243 \pm 0,1	2 \pm 0	77	✓
A297T	237 \pm 45	170 \pm 72	-	×
A311E ²	143 \pm 2	2 \pm 0,2	1	✓
G315R	173 \pm 0,1	2 \pm 0	3	✓
A348T ²	359 \pm 77	3 \pm 1	63	✓
W373R	204 \pm 13	114 \pm 43	-	×
S392N ¹	260 \pm 33	2 \pm 1	110	✓
I407T ²	438 \pm 17	3 \pm 0,2	108	✓
M481T ¹	205 \pm 0,1	5 \pm 0	67	✓
A318E	322 \pm 27	71 \pm 11	2	✓
A318D	300 \pm 21	152 \pm 32	2	✓
A318L	254 \pm 62	74 \pm 32	24	✓
A318V	228 \pm 58	3 \pm 2	100	✓

¹LysP-Varianten konstruiert von B. Weckerlein.

²LysP-Varianten konstruiert von L. Tetsch.

Alle in Tab. 5 aufgelisteten LysP-Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit nach Kontroll-Sequenzierung phänotypisch (Regulation und Transport) charakterisiert.

5.3.2 Zielgerichtete Mutagenese von *lysP*

Eigene in vivo Interaktionsstudien und in vivo Reporteranalysen von Tetsch *et al.* implizieren eine auf intramembranen Wechselwirkungen basierende direkte Interaktion zwischen CadC und LysP [siehe 5.2.3, (Tetsch *et al.*, 2008)]. Phe165 in der TM-Helix von CadC spielt bei dieser Heterooligomerisierung eine essentielle Rolle [siehe 5.2.3, (Tetsch *et al.*, 2008)]. Es ist bekannt, dass aromatische Aminosäuren miteinander via π - π -Wechselwirkungen ihrer planaren Ringe interagieren können und u. a. in die Oligomerisierung von Membranproteinen oder der Selbstassemblierung von löslichen Proteinen involviert sind (Sal-Man *et al.*, 2007). Daher lag bei der Suche nach potentiellen Interaktionspartnern für CadC-F165 der Fokus des zielgerichteten Mutageneseansatzes zunächst auf der Substitution aller aromatischen Aminosäuren von LysP. LysP verfügt über 71 aromatische Aminosäuren, die alle einzeln gegen Leucin ausgetauscht wurden (Abb. 15, Tab. 6, 8). Nach Transformation des Reporterstammes *E. coli* EPCD4 mit den entsprechenden Plasmid-kodierten LysP-Varianten und Wildtyp CadC wurde die regulatorische Funktionalität von allen Varianten getestet. Dabei diente die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Expression des *cadBA* Operons. Die meisten im Zuge des individuellen Austausches aller Aminosäuren mit aromatischem Charakter generierten LysP-Varianten behielten eine regulatorische Aktivität ähnlich wie der Wildtyp (Tab. 8). Die Einführung von Leucin an den Positionen Y102, W106 und F216 (LysP-Y102L, LysP-W106L, LysP-F216L) beeinträchtigte allerdings signifikant die *cadBA* Expression unter Cad-aktivierenden Bedingungen. Somit waren diese LysP-Varianten im Gegensatz zu Wildtyp LysP verstärkt in der Lage, CadC in der Gegenwart von extrazellulärem Lysin zu inhibieren (Tab. 6).

Um die L-[14 C]Lysin-Transportaktivität dieser LysP-Varianten zu analysieren wurde *E. coli* JWCD247 als Transformations-Wirtstamm verwendet. Die Komplementation dieses Stammes mit der Wildtyp Lysinpermease resultierte in einer initialen Transportrate von 10,5 nmol*(min*mg Protein) $^{-1}$ (Tab. 6). Enzymkinetische Studien zeigten, dass Wildtyp LysP als hochaffiner Lysintransporter fungiert ($K_{M(Lys)}$ -Wert = 2,5 μ M) und Lysin mit einer maximalen Geschwindigkeit von 39,5 nmol*(min*mg Protein) $^{-1}$ transportiert (Tab. 7). Im Fall von LysP-F216 war die initiale Aufnahmerate signifikant reduziert (13% der Wildtyp-Rate, Tab. 6), obwohl der $K_{M(Lys)}$ -Wert kaum beeinträchtigt war (Tab. 7). Die 12-fache Reduktion von V_{max} deutete allerdings auf eine Beteiligung von Phe216 an der Translokation des Substrates durch die Zytoplasmamembran (Tab. 7).

Tab. 6: Detaillierte Analyse aller Aminosäurepositionen in LysP, die mittels zielgerichteter Mutagenese identifiziert wurden und deren Substitution in Defekten der Lysin-abhängigen Regulation von CadC resultierte (schwarzer Fettdruck). Die Reportergerneanalysen, die Transportassays und die Verifizierung der Produktion und Membraninsertion aller LysP-Varianten wurden in Analogie zur detaillierten Beschreibung in der Legende von Tab. 5 durchgeführt. Die farbliche Hervorhebung der nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften gruppierten Aminosäuren entspricht dem Farbschema in Abb. 15. Alle Standardabweichungen errechnen sich aus drei unabhängigen Experimenten. ✓, Membranintegration; ×, keine Membranintegration.

LysP-Varianten	β-Galaktosidase-Aktivität [MU]		Lysintransport Initialrate (%)	Membran- integration
	pH 5,8 + 10 mM Lysin	pH 5,8 ohne Lysin		
LysP Wildtyp	269 ± 23	7 ± 4	100 ± 9	✓
Kein LysP	258 ± 39	214 ± 29	2 ± 0,3	×
Substitution von aromatischen Aminosäuren				
LysP-Y102L	89 ± 9	2 ± 1	4 ± 0,4	✓
LysP-Y102F	277 ± 84	4 ± 1	87 ± 19	✓
LysP-W106L ¹	30 ± 13	3 ± 2	20 ± 4	✓
LysP-W106Y ¹	225 ± 31	5 ± 2	158 ± 37	✓
LysP-F216L ¹	94 ± 6	5 ± 4	13 ± 3	✓
LysP-F216Y ¹	222 ± 31	5 ± 2	86 ± 13	✓
Substitution von positiv geladenen Aminosäuren				
LysP-K163A ²	28 ± 8	3 ± 2	24 ± 0,2	✓
LysP-K163R	195 ± 48	4 ± 1	112 ± 2	✓
LysP-K163L	39 ± 7	3 ± 0	24 ± 2	✓
Substitution von negativ geladenen Aminosäuren				
LysP-E222A ²	49 ± 5	4 ± 0	1 ± 0,2	✓
LysP-E222D	214 ± 26	2 ± 0	96 ± 15	✓
LysP-E222L	13 ± 4	6 ± 2	2 ± 0,3	✓
LysP-E230V ²	316 ± 29	189 ± 11	1 ± 0,2	✓
LysP-E230D	297 ± 31	2 ± 0	100 ± 1	✓
LysP-E230L	214 ± 6	131 ± 17	9 ± 6	✓
LysP-D275A_D278A	208 ± 1	100 ± 0,4	88 ± 22	✓
LysP-D275E_D278E	198 ± 3	3 ± 1	89 ± 2	✓
LysP-D275A	205 ± 3	2 ± 0,4	106 ± 14	✓
LysP-D278A	211 ± 83	5 ± 2	116 ± 13	✓
LysP-E438A	233 ± 16	99 ± 4	14 ± 2	✓
LysP-D443A	253 ± 29	156 ± 28	11 ± 2	✓
LysP-D446A	262 ± 8	136 ± 15	13 ± 2	✓

¹LysP-Varianten konstruiert und experimentell charakterisiert von V. Schüppel.

²LysP-Varianten konstruiert von L. Tetsch.

Alle in Tab. 6 aufgeführten im Rahmen dieser Arbeit konstruierten und alle von L. Tetsch generierten LysP-Varianten wurden im Zuge dieser Arbeit phänotypisch (Regulation und Transport) charakterisiert.

Die Varianten LysP-Y102L und LysP-W106L zeigten ebenfalls signifikante Defekte in der Transportaktivität (4% und 20% der Wildtyp-Aktivität), die möglicherweise auf der 11- und 4-fachen Erhöhung der $K_{M(Lys)}$ -Werte basierten (Tab. 6, 7). Beide Substitutionen resultierten darüber hinaus in einer 11- und 14-fachen Reduktion von V_{max} (Tab. 7). Somit scheinen Y102 und W106 an der Bindung des Substrates und/oder dem Translokationsprozess beteiligt zu sein. Varianten mit Austausch, die den aromatischen Charakter dieser

Aminosäurepositionen beibehielten (LysP-Y102F, LysP-W106Y, LysP-F216Y), fungierten als Co-Sensor und Transporter wie Wildtyp LysP (Tab. 6). Y102, W106 und F216 scheinen daher als Kopplungsstellen während der Lysin-Sensierung und/oder bei der konformationell-getriggerten Weiterleitung des Lysinsignals zu CadC von Bedeutung zu sein.

Aromatische Aminosäuren sind des Weiteren an der Vermittlung von auf Kation- π -Wechselwirkungen basierten PPI beteiligt (Dougherty, 1996, Crowley & Golovin, 2005). Daher konzentrierte sich die weitere Suche nach Interaktionspartnern für Phe165 von CadC auf die gerichtete Substitution von allen Argininen und den Lysinresten an den Positionen 163 und 236 in LysP (Abb. 15). Allerdings waren weder alle Argininreste noch Lys236 wichtig für die Lysin-Co-Sensorik (Tab. 8). Die Selektion von K236 beruht auf der Nähe zu den Positionen Glu222 und Glu230, die im Hinblick auf die Co-Sensorik und Lysintransportaktivität entscheidende Rollen spielen (siehe unten). K163 wurde als Äquivalent zu K158 von ApcT wegen der putativen funktionalen Wichtigkeit in Transport und/oder Co-Sensorik ausgewählt (Shaffer *et al.*, 2009). Mittels der Kristallstruktur des Na⁺-unabhängigen Aminosäuretransporters ApcT von *M. jannaschii* zeigten Shaffer *et al.*, dass die Aminogruppe der Seitenkette von ApcT-Lys158 in einer Position äquivalent zu dem in LeuT (Na⁺/Leucin Symporter von *A. aeolicus*) gebundenem Na⁺-Kopplungsion lokalisiert ist (Shaffer *et al.*, 2009). Basierend auf dieser Beobachtung wurde schlussgefolgert, dass ApcT-K158 für Natrium-unabhängigen Transport ausschlaggebend ist, da die Seitenketten-Aminogruppe das Na⁺-Ion von LeuT imitiert (Shaffer *et al.*, 2009). Tatsächlich wurde LysP-K163 als essentiell für die regulatorische Aktivität von LysP identifiziert, da die Varianten LysP-K163A und LysP-K163L eine reduzierte *cadBA* Expression unter Cad-induzierenden Bedingungen hervorriefen (Tab. 6). Außerdem waren beide Varianten gekennzeichnet durch Störungen in der Transportaktivität (24% der Wildtyp-Aktivität, Tab. 6). Die 3-fache Erhöhung des K_{M(Lys)}-Wertes und die 15-fache Erniedrigung von V_{max} von LysP-K163A (Tab. 7) bekräftigt die Hypothese der funktionalen Wichtigkeit dieser Aminosäureposition beim LysP-katalysierten Transportprozess. Durch Insertion einer positiven Ladung an dieser Position durch einen Lys zu Arg Austausch konnte die Wildtyp Regulations- und Transportfunktion von LysP wiederhergestellt werden (Tab. 6). Folglich ist die positive Ladung von K163 substanziell für die konformationell-getriggerte Transduktion des Lysinsignals zu CadC.

Tab. 7: Lysinaufnahme-Kinetik von LysP-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen, die deutliche Defekte in der Lysin-abhängigen Regulation von CadC zeigten (siehe Tab. 6). Die Aufnahme von L-[¹⁴C]Lysin durch *E. coli* JWCD247 nach Komplementation mit pBAD33-*lysP* oder den aufgelisteten LysP-Varianten wurde in Gegenwart von 20 mM D-Laktat (Na⁺-Salz) als Elektronendonator in Gegenwart von Lysinkonzentrationen von 0,125 μ M bis 250 μ M gemessen. Die erhaltenen Daten wurden nach Lineweaver-Burk ausgewertet.

LysP-Varianten	$K_{M(Lys)}$		V_{max}	
	μ M]	Relative Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (-fach)	[nmol*(min*mg Protein) ⁻¹]	Relative Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (-fach)
LysP Wildtyp	2,5 \pm 0,4		39,5 \pm 0,7	
LysP-Y102L	26,4 \pm 9,9	+ 11	2,9 \pm 0,5	- 14
LysP-W106L	9,2 \pm 1,5	+ 4	3,7 \pm 0,6	- 11
LysP-F216L	2,7 \pm 0,1	1	3,2 \pm 0,1	- 12
LysP-K163A	8,2 \pm 0,1	+ 3	2,7 \pm 0,1	- 15
LysP-E222A	22,9 \pm 0,4	+ 9	0,4 \pm 0,1	- 99
LysP-E230V	77,5 \pm 15,9	+ 31	1,2 \pm 0,2	- 33

Die Primärsequenz von LysP enthält eine beträchtliche Anzahl von negativ geladenen Aminosäuren (Asp und Glu, Abb. 15), die möglicherweise an der Vermittlung der CadC/LysP-Heterooligomerisierung durch polare Wechselwirkungen und/oder an der Bindung der α - oder ε -Aminogruppen des Substrates Lysin beteiligt sind. Auf dieser Vermutung basiert der zielgerichtete individuelle Austausch aller konservierten und einiger ausgewählten Asp und Glu (Abb. 15, Tab. 6, 8). Im Zuge dieses Mutageneseansatzes resultierte die Substitution des konservierten Glu an Position 222 durch Ala in der Variante LysP-E222A, die selbst unter Cad-induzierenden Bedingungen CadC extrem inhibierte und somit die *cadBA* Expression in der Gegenwart von Lysin radikal reduzierte (Tab. 6). LysP-E222A war als Transporter nahezu inaktiv (1% der Wildtyp-Aktivität, Tab. 6) und war charakterisiert durch einen 9-fachen Anstieg des $K_{M(Lys)}$ -Wertes und durch eine drastisch 99-fach verringerte maximale Transportrate (V_{max} , Tab. 7). Diese immensen Defekte in der Transportfunktion deuten darauf, dass E222A eine putative Mutation in der Lysin-Bindestelle repräsentiert. Die Charakterisierung von LysP-Varianten mit anderen Substitutionen von E222 (LysP-E222D/L) belegen die Bedeutsamkeit der negativ geladenen Seitenkette an dieser Position (Tab. 6). Die Entfernung der negativ geladenen Seitenkette des konservierten Glu230 (Abb. 15) durch Insertion von Val oder Leu (LysP-E230V/L) erzeugte einen Lysin-unabhängigen Phänotyp (signifikant verringerte Inhibition von CadC in Abwesenheit von Lysin), obwohl beide LysP-Varianten synthetisiert und in die Zytoplasmamembran inseriert wurden (Tab. 6).

Abb. 15: Computergestützter Vergleich der Aminosäuresequenz der Lysinpermease LysP aus *E. coli* mit Transportproteinen der AAT-Familie (Jack *et al.*, 2000) mittels CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007). Farbliche Markierung der zielgerichtet substituierten Aminosäuren: ■, aromatische Aminosäuren; ■, negativ geladene Aminosäuren; ■, positiv geladene Aminosäuren; ■, Asp275 und Asp278; ■, Cysteine; ■, alle identifizierten Aminosäurepositionen, die nach zielgerichtetem Austausch einen Defekt in der Lysin-Co-Sensorik zur Folge hatten. Farbliche Markierungen des Sequenzvergleiches nach Bearbeitung des Alignments mittels GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997): ■, identische oder sehr strukturverwandte Aminosäuren in allen Sequenzen; ■, identische oder sehr verwandte Aminosäuren in mindestens 80% der Sequenzen; ■, identische oder sehr verwandte Aminosäuren in mindestens 60% der Sequenzen. Ecoli, *Escherichia coli*; Bacil, *Bacillus subtilis*; LysP_Ecoli, Lysin-Permease LysP von *E. coli*; CycA_Ecoli, Serin/Alanin/Glycin/Cycloserin/H⁺-Symporter CycA von *E. coli*; PheP_Ecoli, Phenylalanin/H⁺-Symporter PheP von *E. coli*; AroP_Ecoli, Phenylalanin/Tyrosin/Tryptophan/H⁺-Symporter AroP von *E. coli*; ProY_Ecoli, kryptischer Prolin/H⁺-Symporter ProY von *E. coli*; AnsP_Ecoli, putativer Asparagin/H⁺-Symporter AnsP von *E. coli*; AapA_Bacil, putative Serin/Alanin/Glycin-Permease AapA von *B. subtilis*; RocE_Bacil, Arginin/Ornithin/γ-Aminobuttersäure-Permease RocE von *B. subtilis*; HutM_Bacil, putative Histidin-Permease HutM von *B. subtilis*; RocC_Bacil, Arginin/Ornithin-Permease RocC von *B. subtilis*; GabP_Bacil; γ-Aminobuttersäure-Permease GabP von *B. subtilis* (Keseler *et al.*, 2005, Karp *et al.*, 2011).

Die Transportaktivität von LysP-E230V und LysP-E230L war ebenfalls extrem reduziert (1% und 9% der Wildtyp-Aktivität, Tab. 6). Es wird vermutet, dass der 31-fach erhöhte $K_{M(Lys)}$ -Wert und die 33-fache Abnahme von V_{max} , die bei der kinetischen Charakterisierung von LysP-E230V beobachtet wurden (Tab. 7), eine maßgebliche Rolle der negativ geladenen Seitenkette von Glu230 an der Substratbindung und/oder einem darauffolgenden Schritt im Transportzyklus reflektieren. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine LysP-Variante, die die saure Seitenkette an Position 230 durch eine Glu zu Asp Substitution (LysP-E230D) beibehielt, eine Wildtyp-ähnliche Co-Sensorik- und Lysinaufnahmeaktivität aufwies (Tab. 6).

Da mittels in vivo Interaktionsstudien (siehe 5.2.3) gezeigt wurde, dass sich zusätzliche CadC/LysP Kontaktstellen in der periplasmatischen Domäne von CadC befinden, wurden alle acht negativ geladenen periplasmatisch-exponierten Aminosäuren von LysP einzeln gerichtet ersetzt. Die Lokalisation dieser Reste wurde von dem LysP-Topologiemodell nach TOPCONS (siehe Abb. 4) und dem Homologiemodell basierend auf ApcT aus *M. jannaschii* (siehe Abb. 5) abgeleitet. Durch die Substitution von E438, D443 und D446 konnten Varianten (LysP-E438A, LysP-D443A, LysP-D446A) generiert werden, die einen Lysin-unabhängigen Phänotyp ausbildeten, der in der signifikant verringerten Hemmung von CadC in Abwesenheit von Lysin begründet war (Tab. 6). Alle drei LysP-Varianten zeichneten sich

durch deutliche Defekte in der Transportaktivität aus (14%, 11% und 13% der Wildtyp-Aktivität, Tab. 6). Da die Produktion und die Membranintegration nicht beeinträchtigt waren, partizipieren die Positionen E438, D443 und D446 scheinbar an der konformationell-getriggerten Lysin-signalweiterleitung zu CadC. Es muss abschließend angemerkt werden, dass Western Blot-Analysen mit dem Reporterstamm *E. coli* EPCD4 ergaben, dass alle LysP-Varianten, die im Rahmen dieser Arbeit erzeugt und charakterisiert wurden, in ähnlichen Mengen wie Wildtyp LysP synthetisiert und in die Zytoplasmamembran inseriert wurden (Tab. 6, 8).

Im Falle aller bislang beschriebenen LysP-Varianten (Tab. 6) war sowohl die Lysinbindung und/oder der Translokationsprozess signifikant beeinträchtigt. Diese LysP-Varianten waren nicht mehr in der Lage, das Lysin-signal zu CadC weiterzuleiten, da sie in potentiellen permanent inhibitorischen (LysP-Y102L, LysP-W106L, LysP-F216L, LysP-K163A, LysP-E222A) oder nicht-inhibitorischen (LysP-E230V, LysP-E438A, LysP-D443A, LysP-D446A) Signalzuständen fixiert waren (Tab. 6). Basierend auf diesen Beobachtungen wird spekuliert, dass durch Lysinbindung und/oder -transport induzierte konformationelle Änderungen von LysP eine Voraussetzung sind für die Transduktion und Kommunikation des Signals von Co-Sensor zu Sensor (konformationelle Kopplung/Hemmung).

Cysteine spielen durch die Fähigkeit sowohl intra-, als auch intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden zu können eine wichtige Rolle für die Integrität von Proteinstruktur und -funktion. Es sind zahlreiche Beispiele bekannt und beschrieben, bei denen die Bildung von Disulfidbrücken u. a. für die Proteinstabilität, Ligandenbindung, Dimerisierung oder Aktivierung wichtig ist (Zheng *et al.*, 1998, Bekker *et al.*, 2010, Tetsch *et al.*, 2011, Fengler *et al.*, 2012). Daher wurden im Zuge des zielgerichteten Mutageneseansatzes alle drei Cysteinreste von LysP durch Alanin ersetzt (Abb. 15, Tab. 8). Jedoch hatten die Substitutionen in LysP keinen Effekt auf die Lysin-abhängige Regulation von CadC (Tab. 8).

Tab. 8: Zusammenfassung aller LysP-Varianten, die mittels zielgerichteter Mutagenese generiert wurden und keinen Effekt auf die Lysin-abhängige Regulation von CadC zeigten (Wildtyp Phänotyp). Die Reportergermanalysen, Transportassays und die Verifizierung der Produktion und Membraninsertion aller LysP-Varianten wurden in Analogie zur detaillierten Beschreibung in der Legende von Tab. 5 durchgeführt. Die farbliche Hervorhebung der nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften gruppierten Aminosäuren entspricht dem Farbschema in Abb. 15. Alle Initialraten, die ohne Standardabweichung aufgelistet sind, repräsentieren die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. ✓, Membranintegration; ×, keine Membranintegration.

LysP-Varianten	β-Galaktosidase-Aktivität [MU]		Lysintransport Initialrate (%)	Membran- integration
	pH 5,8 + 10 mM Lysin	pH 5,8 ohne Lysin		
LysP Wildtyp	269 ± 23	7 ± 4	100 ± 9	✓
Kein LysP	258 ± 39	214 ± 29	2 ± 0,3	×
Substitution von aromatischen Aminosäuren				
LysP-F37L ²	224 ± 34	24 ± 13	42 ± 11	✓
LysP-Y55L ²	286 ± 37	11 ± 5	5 ± 2	✓
LysP-Y63L_F64L	268 ± 33	14 ± 10	56 ± 14	✓
LysP-Y75L	217 ± 40	3 ± 2	82 ± 12	✓
LysP-F82L ²	290 ± 42	15 ± 17	64 ± 2	✓
LysP-Y85L_Y89L ¹	315 ± 43	3 ± 1	16	✓
LysP-F94L	292 ± 59	9 ± 3	60 ± 0	✓
LysP-F96L ²	234 ± 28	4 ± 1	180 ± 14	✓
LysP-W100L ²	224 ± 8	2 ± 0,3	97 ± 14	✓
LysP-W103L ²	190 ± 19	7 ± 2	44 ± 4	✓
LysP-Y104L ¹	282 ± 2	6 ± 4	164	✓
LysP-W123L_W124L_F125L ²	294 ± 26	20 ± 8	44 ± 15	✓
LysP-W131L ²	241 ± 47	2 ± 1	124 ± 40	✓
LysP-W133L ²	239 ± 17	0 ± 0	30 ± 23	✓
LysP-F137L_F142L ²	312 ± 18	25 ± 14	71 ± 20	✓
LysP-Y146L ²	255 ± 48	8 ± 6	39 ± 3	✓
LysP-F152L ²	232 ± 31	10 ± 10	16 ± 4	✓
LysP-Y157L_W158L_F159L ¹	409 ± 15	9 ± 7	10	✓
LysP-F170L ²	314 ± 42	20 ± 13	66 ± 12	✓
LysP-F182L	194 ± 41	14 ± 10	73 ± 13	✓
LysP-W190L_W193L_F200L ²	236 ± 36	6 ± 4	30 ± 6	✓
LysP-F204L ²	147 ± 6	5 ± 1	35 ± 16	✓
LysP-F218L ²	301 ± 48	35 ± 17	17 ± 1	✓
LysP-F246L_W247L	166 ± 21	4 ± 1	57 ± 3	✓
LysP-F252L ²	217 ± 10	3 ± 1	3 ± 2	✓
LysP-F255L ²	221 ± 22	0 ± 0	182 ± 76	✓
LysP-Y253L	259 ± 0,1	2 ± 0	26	✓
LysP-Y266L ²	247 ± 19	26 ± 24	90 ± 30	✓
LysP-F284L ²	163 ± 23	5 ± 2	8 ± 3	✓
LysP-F288L ²	242 ± 17	6 ± 2	58 ± 6	✓
LysP-Y317L ²	277 ± 40	0 ± 0	12 ± 3	✓
LysP-Y324L ²	269 ± 45	1 ± 0	77 ± 22	✓
LysP-F336L ²	254 ± 3	19 ± 22	117 ± 21	✓
LysP-Y350L	201 ± 62	12 ± 4	48 ± 1	✓
LysP-F360L_F365L ²	249 ± 38	21 ± 13	73 ± 19	✓
LysP-Y371L ²	265 ± 39	13 ± 4	11 ± 3	✓
LysP-W373L	265 ± 0,1	2 ± 0	95	✓
LysP-F383L_W386L ²	192 ± 22	25 ± 12	78 ± 11	✓
LysP-Y394L_F396L	199 ± 38	25 ± 2	19 ± 11	✓

LysP-Y400L ²	239 ± 26	27 ± 39	71 ± 10	✓
LysP-Y412L ²	253 ± 32	2 ± 1	43 ± 18	✓
LysP-F416L ²	270 ± 21	2 ± 1	169 ± 55	✓
LysP-F417L ²	208 ± 2	4 ± 3	112 ± 35	✓
LysP-F423L_F425L ²	225 ± 17	35 ± 19	90 ± 1	✓
LysP-Y437L_F440L_W447L	186 ± 33	17 ± 10	101 ± 28	✓
LysP-Y454L ²	197 ± 40	32 ± 32	124 ± 7	✓
LysP-F460L ²	309 ± 32	23 ± 8	54 ± 3	✓
LysP-W464L	269 ± 20	7 ± 7	62	✓
LysP-F465L	215 ± 41	2 ± 2	97	✓
LysP-Y467L	348 ± 4	14 ± 8	67	✓
LysP-F475L_Y478L_F483L	302 ± 5	8 ± 1	60 ± 9	✓
Substitution von positiv geladenen Aminosäuren				
LysP-R14L ²	257 ± 57	35 ± 19	49 ± 14	✓
LysP-R15L ²	299 ± 15	11 ± 8	38 ± 6	✓
LysP-R20L ¹	338 ± 43	3 ± 3	10	✓
LysP-R150L ²	248 ± 41	7 ± 3	68 ± 3	✓
LysP-K236A	300 ± 28	2 ± 1	138	✓
LysP-R240L	436 ± 29	3 ± 1	128	✓
LysP-R248L ²	251 ± 23	8 ± 3	2 ± 1	✓
LysP-R273L ²	263 ± 40	7 ± 3	54 ± 2	✓
LysP-R321L ²	258 ± 44	42 ± 24	2 ± 0	✓
LysP-R334L_R341L ¹	387 ± 5	0 ± 0	103	✓
LysP-R346L ²	243 ± 31	11 ± 5	53 ± 4	✓
LysP-R395L	258 ± 12	10 ± 3	11	✓
LysP-R397L ²	249 ± 33	37 ± 44	17 ± 5	✓
LysP-R398L	291 ± 15	12 ± 3	70	✓
LysP-R413L ²	219 ± 23	3 ± 1	40 ± 5	✓
LysP-R477L ²	317 ± 12	27 ± 25	55 ± 5	✓
Substitution von negativ geladenen Aminosäuren				
LysP-E16A ¹	286 ± 80	0 ± 0	105	✓
LysP-E71A ¹	325 ± 35	3 ± 2	8	✓
LysP-E91A	229 ± 2	22 ± 2	64	✓
LysP-D113N	354 ± 0.1	3 ± 0.1	5	✓
LysP-D127A	244 ± 6	7 ± 0.2	131	✓
LysP-E154V ¹	308 ± 7	0 ± 0	141	✓
LysP-E156V ¹	358 ± 12	0 ± 0	16	✓
LysP-E197A	234 ± 0.1	6 ± 1	74	✓
LysP-E232Q	383 ± 10	19 ± 13	71	✓
LysP-D233N	407 ± 64	4 ± 1	71	✓
LysP-D268A	171 ± 3	4 ± 3	138	✓
Substitution von allen Cysteinen				
LysP-C328A ¹	273 ± 16	0 ± 0	108	✓
LysP-C359A ¹	287 ± 92	0 ± 0	132	✓
LysP-C428A ¹	285 ± 29	0 ± 0	150	✓

¹LysP-Varianten konstruiert von L. Tetsch.

²LysP-Varianten konstruiert und experimentell charakterisiert von V. Schüppel.

Alle in Tab. 8 aufgeführten im Rahmen dieser Arbeit ausgetauschten positiv und negativ geladenen Aminosäuren und alle von L. Tetsch generierten LysP-Varianten wurden im Zuge dieser Arbeit phänotypisch (Regulation und Transport) charakterisiert. Die im Zuge dieser Arbeit konstruierten LysP-Varianten LysP-Y63L_F64L, -Y75L, -F94L, -F182L, -F246L_W247L, -Y350L, -Y394L_F396L und -F475L_Y478L_F483L wurden an V. Schüppel für die phänotypische Charakterisierung übergeben.

5.3.3 Transportdefiziente LysP-Varianten

Alle in Tab. 5 und 8 aufgelisteten LysP-Varianten wurden neben der regulatorischen Fähigkeit und Membraninsertion auch hinsichtlich der Transportaktivität analysiert. So wurden Positionen in LysP identifiziert, die, ohne die Lysin-Co-Sensorik zu beeinträchtigen, Defekte in der Lysinaufnahme bedingen (siehe Tab. 5, 8). Während die deutliche Reduktion des Lysinimports ($< 10\%$ der Wt-Aktivität) von LysP-A311E, -G315R und -A318E/D (siehe Tab. 5) vermutlich auf der artifiziellen Einführung von geladenen und länger-kettigen Aminosäuren und damit verbundenen groben Konformationsänderungen von LysP beruhen, kann derzeit über die Ursache der Transportdefekte der in Tab. 8 aufgeführten Varianten nur spekuliert werden. Ohne kinetische Analyse dieser Varianten kann keine valide Aussage darüber getroffen werden, ob die korrespondierenden Positionen eher an der Lysinbindung oder an einem anderen Schritt des alternierenden-Zugangsmechanismus beteiligt sind.

In einer kürzlich publizierten Studie von Kaur *et al.* wurde mittels Ligandendockanalysen/-kalkulationen basierend auf dem Homologiemodell des LysP-Orthologs STM2200 aus *Salmonella typhimurium* LT2 eine potentielle Lysinbindestelle für STM2200 vorgeschlagen, die durch die polaren, aromatischen und aliphatischen Reste M61, V62, I65, N105, M212, G215, F216, F218, Q219, G220, T221, E222, A385, W386, G388, I389, I391, S392, R395, I431 und T432 ausgekleidet wird (Kaur *et al.*, 2013). Die Bindung des Substrats L-Lysin scheint spezifisch auf ionischen Wechselwirkungen mit der Carboxylgruppe von E222 und der Guanidingruppe von R395, sowie auf Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylsauerstoffatomen von G215 und G388 zu beruhen (Kaur *et al.*, 2013). Da *E. coli* LysP und *S. typhimurium* STM2200 eine Sequenzidentität von 94% und -ähnlichkeit von 97% aufweisen [Sequenzanalyse mittels CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007) und GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997)], konnte diese Postulation durch die in vivo Transportdaten mit *E. coli* LysP-Varianten der vorliegenden Studie teilweise gestützt und auf *E. coli* LysP übertragen werden: Die Entfernung der negativ geladenen Seitenkette an Position E222 (LysP-E222A, siehe Tab. 6) und der positiv geladenen Seitenkette an Position R395 (LysP-R395L, siehe Tab. 8) resultierte in drastischen Defekten der Transportaktivität (1% bzw. 11% der Wildtyp-Aktivität). Diese Beobachtung impliziert in Analogie zu STM2200 eine Funktion von E222 und R395 als mögliche direkte Substratbindestellen (G215 und G388 wurden im Zuge der vorliegenden detaillierten *lysP*-Mutagenesestudie nicht substituiert).

Von den von Kaur *et al.* postulierten Aminosäuren, die an der Bildung der Lysinbindetasche beteiligt sind (Kaur *et al.*, 2013), wurden die Aromaten F216, F218 und W386 [siehe Tab. 6,

8, (Schüppel, 2011)] und S392 [siehe Tab. 5, (Weckerlein, 2010)] ausgetauscht (LysP-F216L, -F218L, F383L_W386L und -S392N). Während F216 und F218 vermutlich in noch unbekannter Weise an der Translokation des Substrats involviert sind (13% bzw. 17% der Wt-Aktivität), hatte die Mutation der Positionen W386 und S392 keinen Effekt auf die LysP-vermittelte Transportaktivität (78% bzw. 110% der Wt-Aktivität).

5.3.4 Funktionale Signifikanz der Aspartate 275 und 278 von LysP für die Interaktion mit CadC

Der detaillierte Vergleich der Aminosäuresequenz von *E. coli* LysP mit Primärsequenzen von anderen Mitgliedern der AAT-Subfamilie [siehe Abb. 15, (Jack *et al.*, 2000)] ließ einen LysP-spezifischen Bereich bestehend aus acht Aminosäuren erkennen. Das LysP-Topologiemodell nach TOPCONS (siehe Abb. 4) und das LysP-Homologiemodell (siehe Abb. 5) implizieren eine Lokalisation dieses Segments innerhalb der periplasmatischen Schleife 4 (P4), die die TM-Helices 7 und 8 verbindet. Diese LysP-spezifische Region umfasst die Aspartate 275 und 278 (siehe Abb. 15). Da mittels *in vivo* Interaktionsstudien (siehe 5.2.2) gezeigt wurde, dass die physikalische CadC/LysP-Interaktion durch externen pH beeinflusst wird und durch zusätzliche periplasmatische Wechselwirkungen vermittelt und/oder stabilisiert wird, wurde angenommen, dass diese beiden periplasmatisch exponierten negativ geladenen Aminosäuren in LysP für die Regulation von CadC funktional wichtig sind. Die simultane Substitution von D275 und D278 resultierte in einer LysP-Variante (LysP-D275A_D278A), die eine verringerte Inhibition von CadC in der Abwesenheit von Lysin aufwies (siehe Tab. 6), aber keine Defekte in der Katalyse der Lysinaufnahme zeigte (88% der Wildtyp-Aktivität, siehe Tab. 6). Die korrespondierenden Einfach-Austausche (LysP-D275A, LysP-D278A) und die konservative Doppel-Substitution (LysP-D275E_D278E) verhielten sich in Bezug auf Transport und Regulation wie Wildtyp LysP (siehe Tab. 6). Auf diesen Resultaten beruht die Hypothese, dass beide Asp als potentielle periplasmatische Kontaktstellen innerhalb der heterooligomeren Grenzfläche fungieren.

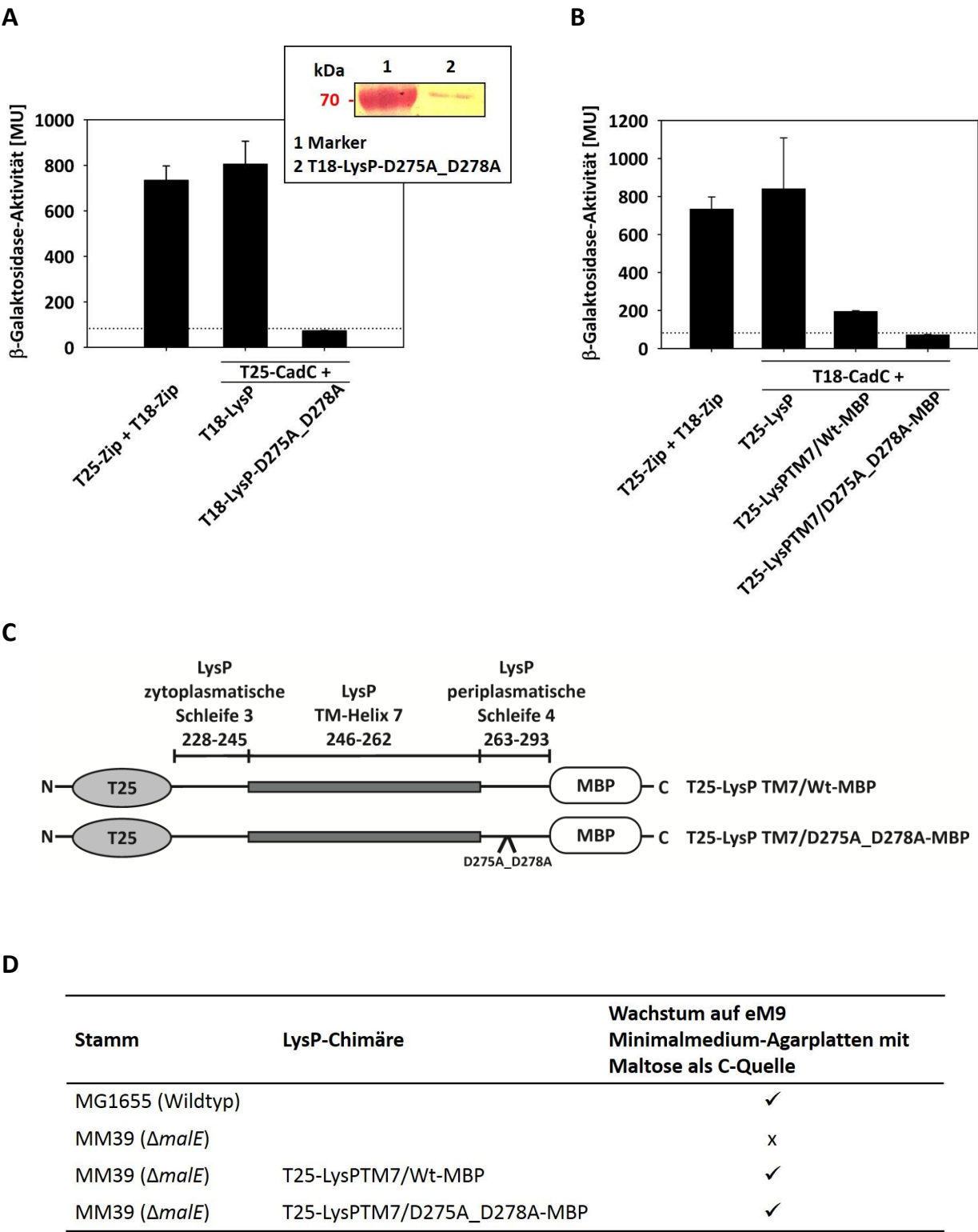


Abb. 16: Funktionale Signifikanz der periplasmatisch exponierten Aspartatreste 275 und 278 in LysP für die Interaktion mit CadC. A. Reportergenanalysen wurden nach Co-Transformation des *E. coli* Stammes BTH101 mit Plasmidpaaren, kodierend für T25-CadC und den angegebenen T18-(Volllängen-)LysP-Hybridkonstrukten, in Analogie zur detaillierten Beschreibung in Legende von Abb. 7 durchgeführt. Nebenbild von A. Nachweis der Produktion und Integration von T18-LysP-D275A_D278A in die Zytoplasmamembran von *E. coli* BL21(DE)pLysS. Primärer Antikörper: Penta-His-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000). B. *E. coli* BTH101 wurde mit Plasmidpaaren co-transformiert, die für T18-CadC und die angegebenen T25-LysPTM7-Chimären kodieren. Die Reportergenanalysen erfolgten gemäß der Beschreibung in Legende von Abb. 7. C. Schematische Repräsentation der Architektur der T25-LysP-TM7-MBP-Chimären, die hinsichtlich der Interaktion mit T18-CadC getestet wurden. D. Kontrolle der Biosynthese und Membraninsertion der T25-LysPTM7-MBP-Chimären (siehe Legende von Abb. 12).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Interaktion zwischen den Hybridproteinen T18-LysP-D275A_D278A und T25-CadC mittels BACTH getestet. T18-LysP-D275A_D278A umfasst Volllängen-LysP mit den Ala-Austauschen an Position Asp275 und Asp278, N-terminal fusioniert an T18. Die unter dem Interaktions-Schwellenwert gelegenen β -Galaktosidase-Aktivitäten deuteten tatsächlich auf eine Abhängigkeit der CadC/LysP-Interaktion von diesen negativ geladenen Aminosäuren (Abb. 16A). Für die Verifizierung der Biosynthese und Membraninsertion wurde dem Konstrukt T18-LysP-D275A_D278A C-terminal ein His₆-Tag angefügt. Western Blot-Analysen mit Penta-His Antikörpern zeigten, dass das Hybridprotein (~72 kDa [54 kDa (LysP Wildtyp) + 18 kDa (T18)]) produziert und in die Zytoplasmamembran verankert wurde (Abb. 16A, Nebenbild).

Darüber hinaus wurde die funktionale Bedeutung von D275 und D278 mit Hilfe von T25-LysP-Hybriden analysiert, die neben der zytoplasmatischen Schleife 3, die TM-Helix 7 und die darauffolgende periplasmatische Schleife 4 (Wildtyp oder mit den Austauschen D275A_D278A) umfasste (Abb. 16B). Für eine korrekte Membrantopologie und die Kontrolle der Membraninsertion wurde MBP an das C-terminale Ende dieser LysP-TM7-MBP-Chimären fusioniert (Abb. 16C). Komplementations- und Wachstumstests mit *E. coli* MM39 mit Maltose als einziger C-Quelle implizierten eine korrekte Lokalisation von MBP im Periplasma und von TM7 in der Zytoplasmamembran (Abb. 16D). Interessanterweise waren die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten des Plasmidpaares T18-CadC/T25-LysPTM7/Wt-MBP 50% höher (schwache Interaktion) als die des Paares T18-CadC/T25-LysPTM7/D275A_D278A-MBP, das β -Galaktosidase-Aktivitäten unterhalb des Interaktions-Schwellenwertes produzierte (keine Interaktion, Abb. 16B). Die Resultate dieses artifiziellen

BACTH-Ansatzes unterstützen die funktionale Signifikanz von D275 und D278 für die CadC/LysP-Interaktion als mögliche Kontaktstellen.

5.3.5 Effekt der Überproduktion der LysP-Varianten auf die CadC-vermittelte *cadBA* Expression

Neely und Mitarbeiter zeigten, dass die Überproduktion von Plasmid-kodiertem LysP unter Cad-induzierenden Bedingungen in einer Hemmung der CadC-Aktivität und somit in einer Repression der *cadBA* Expression resultierte (Neely *et al.*, 1994). Infolgedessen wurden die LysP-Varianten LysP-E230V, -D275A_D278A, -E438A, -D443A und -D446A, die durch einen Lysin-unabhängigen Phänotyp charakterisiert waren (siehe Tab. 6) daraufhin getestet, ob der Verlust der Hemmung von CadC durch Überproduktion dieser LysP-Varianten aufgehoben werden kann. Die Überexpression von *lysP* wurde mit Hilfe des artifiziellen pBAD Expressionssystems erzielt (Guzman *et al.*, 1995). Western Blot-Analysen zeigten, dass alle LysP-Varianten in gleichen Mengen produziert und in die Zytoplasmamembran inseriert wurden (siehe Tab. 6). Wildtyp LysP-Überproduktion verringerte die Wildtyp *cadBA* Expression um 61% (Tab. 9). Durch Erhöhung der Proteinlevel der Varianten LysP-E230V, -D275A_D278A, -E438A, -D443A und -D446A wurde unter induzierenden Bedingungen keine bzw. sehr geringe Hemmung der CadC-Aktivität erreicht (Tab. 9). Die Defekte in der Inhibition von CadC bzw. die permanent nicht-inhibitorischen Signalzustände konnten folglich nicht durch Überproduktion dieser LysP-Varianten überwunden werden. Im Gegensatz hatte die Überproduktion der CadC-permanent hemmenden LysP-Varianten LysP -Y102L, -W106L, -F216L, -K163A und -E222A einen verstärkten inhibierenden Effekt auf die CadC-vermittelte *cadBA* Expression (90-97% Inhibition, Tab. 9).

Diese beobachtete Blockade der Wildtyp CadC-Aktivität unter Cad-aktivierenden Bedingungen durch artifizielle Veränderung (Überproduktion) des Gleichgewichtes zu Gunsten von Wildtyp LysP bzw. der permanent inhibitorischen LysP-Varianten kann durch die auf erhöhten LysP-Mengen basierte mögliche Unterbindung von Konformationsänderungen des CadC-Monomers bzw. -Dimers erklärt werden, die für eine unbeeinträchtigte CadC-vermittelte Signaltransduktion nötig sind.

Die Überproduktion von LysP-E222A (permanent inhibitorisch) konnte im Hintergrund von CadC-F165A (Tetsch *et al.*, 2008) den auf dieser CadC-Mutation basierten Lysin-unabhängigen Phänotyp nicht kompensieren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung bekräftigt die Funktion von Phe 165 als Kontaktstelle zwischen CadC und LysP.

Tab. 9: Einfluss der Überproduktion von Wildtyp LysP und LysP-Varianten unter Cad-induzierenden Bedingungen auf die CadC-vermittelte *cadBA* Expression. Die Reporteranalysen wurden in Analogie zur detaillierten Beschreibung in der Legende von Tab. 5 durchgeführt. Die Überexpression von *lysP* wurde durch die Zugabe von 0,2% (w/v) Arabinose induziert.

LysP-Varianten	β -Galaktosidase-Aktivität [MU] pH 5,8 + 10 mM Lysin		Grad der Hemmung (%)
	Keine LysP-Überproduktion	LysP-Überproduktion	
LysP Wildtyp	269 \pm 23	106 \pm 9	61
Kein LysP	258 \pm 39	270 \pm 38	Keine Hemmung
LysP-Y102L	89 \pm 9	3 \pm 2	97
LysP-W106L ¹	30 \pm 13	3 \pm 1	90
LysP-F216L ¹	94 \pm 6	4 \pm 3	96
LysP-K163A	28 \pm 8	2 \pm 0,1	93
LysP-E222A	49 \pm 5	5 \pm 1	90
LysP-E230V	316 \pm 29	298 \pm 26	6
LysP-D275A_D278A	208 \pm 1	217 \pm 17	Keine Hemmung
LysP-E438A	233 \pm 16	328 \pm 17	Keine Hemmung
LysP-D443A	253 \pm 29	380 \pm 7	Keine Hemmung
LysP-D446A	262 \pm 8	372 \pm 7	Keine Hemmung

¹LysP-Varianten experimentell charakterisiert von V. Schüppel.

5.4 Einfluss von LysP-Orthologen auf die *cadBA* Expression in *E. coli*

Die PPI zwischen CadC und LysP beruht neben periplasmatischen (Rauschmeier *et al.*, 2014) auf transmembranen Wechselwirkungen (Tetsch *et al.*, 2008). Während in der TM-Helix von CadC die Aminosäureposition Phe165 als potentielle direkte Kontaktstelle zwischen Sensor und Transporter identifiziert wurde (Tetsch *et al.*, 2008), ist der korrespondierende intramembrane Interaktionspartner für CadC-F165 in LysP noch nicht bekannt. In mehreren Versuchsansätzen für das Screening nach TM-Helices/-Positionen in LysP, die an der Interaktion mit CadC-F165 beteiligt sind, führte die Deletion kompletter TM-Helices von LysP zu fehlerhafter Biosynthese und Membraninsertion (Daten nicht gezeigt). Um diese Probleme zu umgehen und korrekte Produktion bzw. Topologie in der Membran zu gewährleisten, sollten chimäre Transportproteine konstruiert werden, wobei jeweils die 12 TM-Helices eines zu *E. coli* LysP orthologen Transportproteins, das durch fehlende Interaktion mit CadC charakterisiert ist, durch die entsprechenden 12 LysP-TM-Domänen ersetzt werden sollten. Darauf folgende in vivo Reporteranalysen mit *E. coli* EPCD4 sollten dann Aufschluss darüber geben, ob auf diesem Wege ein nicht mit CadC interagierendes LysP-Ortholog zu einer Transporterchimäre mit der Fähigkeit die Aktivität des Sensors in Abwesenheit von Lysin zu inhibieren umgewandelt werden kann. Diese mögliche Eingrenzung von potentiellen Interaktions-TM-Bereichen in LysP sollte im

anschließenden gerichteten Mutageneseansatz (Einzelaustausche aller Aminosäurereste der entsprechenden TM-Regionen von LysP) die spezifische Suche nach Partnern für CadC-Phe165 erleichtern. Im Hinblick auf die Konstruktion dieser Transporterchimären mussten zunächst in Vorversuchen orthologe Transportproteine zu *E. coli* LysP ausgewählt, in den Arabinose-induzierbaren Vektor pBAD33 kloniert und hinsichtlich der Lysin-abhängigen Regulation von CadC charakterisiert werden.

LysP-Orthologe sind innerhalb der Domäne der Bacteria weit verbreitet und sind u. a. in anderen Gram-negativen Proteobacteria und zahlreichen Gram-positiven Klassen wie Actinobacteria und Bacilli zu finden. Im Gegensatz dazu ist das Vorkommen von CadC auf kommensale Gram-negative Enterobacteria (Ausnahme: *Vibrionaceae*) beschränkt. Für den initialen Test, ob alternative LysP-Orthologe eine *lysP*-Deletion in *E. coli* kompensieren können, wurden fünf orthologe Proteine (Tab. 10) aus *Photorhabdus luminescens* (82% Aminosäuresequenzidentität zu *E. coli* LysP), *Micrococcus luteus* (58% Identität), *Bacillus megaterium* (60% Identität), *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* (51% Identität) und *Helicobacter pylori* P12 (32% Identität) ausgewählt.

Tab. 10: Statistischer Report: Analyse des Sequenzalignments diverser LysP-Orthologe (siehe Abb. 18) hinsichtlich konservierter (Identität) und konservativ substituierter (Ähnlichkeit) Aminosäuren (Nicholas *et al.*, 1997). Angegeben sind die prozentuale Identität und die prozentuale Ähnlichkeit der aufgelisteten LysP-Orthologen in Relation zu *E. coli* LysP (100%). -, keine Identifikation eines homologen Proteins.

Bakterienspezies	LysP-Identität [%]	LysP-Ähnlichkeit [%]	CadC-Identität [%]
<i>Escherichia coli</i>	100	100	100
<i>Photorhabdus luminescens</i>	82	91	-
<i>Micrococcus luteus</i>	58	77	-
<i>Bacillus megaterium</i>	60	77	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	51	70	-
<i>Helicobacter pylori</i> P12	32	55	-

Während das LysP-Ortholog aus *P. luminescens* mit und ohne Überproduktion ähnliche regulatorische Kapazitäten wie *E. coli* LysP aufwies (Abb. 17A), konnte im Falle der LysP-Orthologen aus *M. luteus*, *B. megaterium*, *S. carnosus* und *H. pylori* ohne Überproduktion keine Lysin-abhängige Regulation von CadC erzielt werden (Abb. 17A). Interessanterweise resultierte die Erhöhung der Proteinlevel (mit Überproduktion) von *M. luteus* LysP in einer zu *E. coli* LysP (ohne Überproduktion) ähnlichen Regulation von CadC (Abb. 17A).

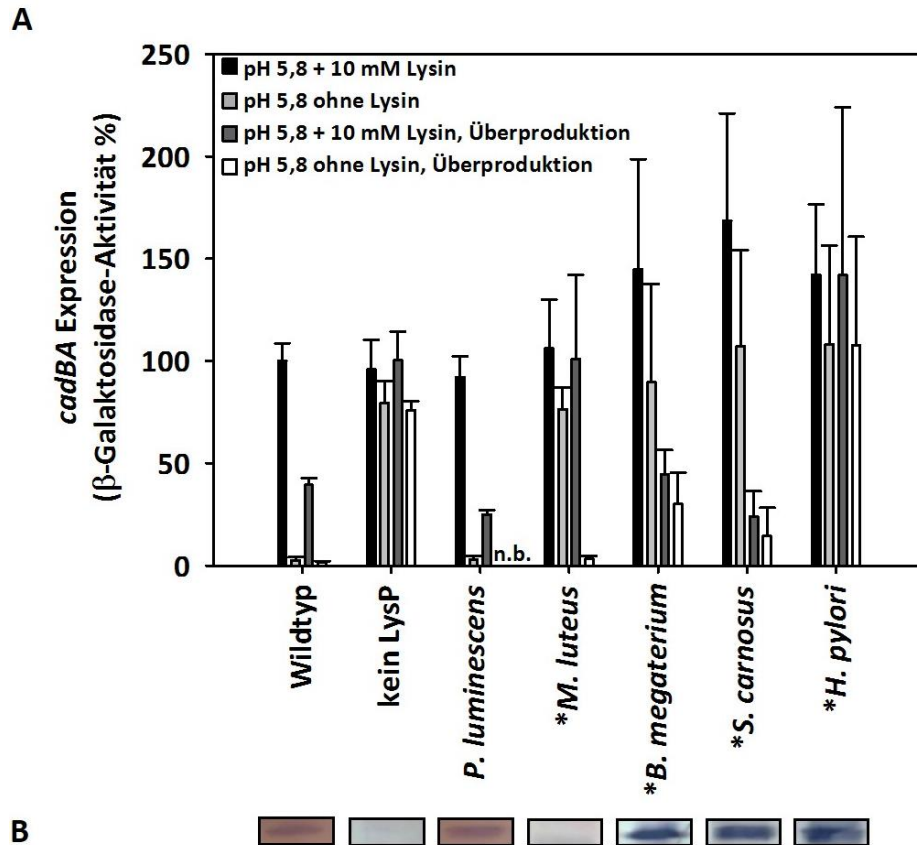


Abb 17: Heterologe Expression von LysP-Orthologen (pBAD33-basiert) in dem *lysP*-defizienten *E. coli* Stamm EPCD4. A. Einfluss von LysP-Orthologen auf die CadC-vermittelte *cadBA* Expression in *E. coli* EPCD4. Die Reportergermanalysen wurden entsprechend zur detaillierten Beschreibung in der Legende von Tab. 5 durchgeführt. Die Überexpression von *lysP* wurde durch die Zugabe von 0,2% (w/v) Arabinose induziert (dunkelgraue und weiße Balken). B. Die Verifizierung der Produktion und Integration der LysP-Orthologen in die Zytoplasmamembran von *E. coli* EPCD4 erfolgte gemäß der Darstellung in der Legende von Tab. 5. *, LysP-Orthologe kloniert und experimentell charakterisiert von M. Wieland, deren Bachelorarbeit im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde (Wieland, 2013); n.b., nicht bestimmt.

Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Western Blot-Analyse (Abb. 17B), die deutlich zeigt, dass *M. luteus* LysP selbst mit Überproduktion nur in sehr geringen Mengen in die Zytoplasmamembran inseriert wurde, und impliziert daher, dass sich die *E. coli* CadC/*M. luteus* LysP-Ratio ohne *M. luteus* LysP-Überproduktion zu Gunsten von CadC verschoben hat und folglich keine Hemmung des Sensors in Abwesenheit von Lysin erreicht werden konnte (siehe 5.3.5). Überproduktion von *B. megaterium* und *S. carnosus* LysP hatte im Vergleich zu *E. coli* LysP eine signifikante Erhöhung der in die Zytoplasmamembran inserierten Proteinmenge zur Folge (Abb. 17B) und bewirkte selbst unter Cad-induzierenden Bedingungen eine drastische Reduktion der *cadBA* Expression (Abb. 17A). Obwohl in diesen initialen Experimenten durch das verwendete pBAD33-Expressionssystem im Falle von *B.*

megaterium und *S. carnosus* LysP noch kein adäquates zelluläres Proteinlevel der Transporter für eine korrekte Lysin-abhängige Regulation von CadC eingestellt werden konnte, implizieren die Resultate, dass beide LysP-Orthologe in der Lage sind mit *E. coli* CadC zu interagieren. Die Beobachtung, dass trotz Biosynthese und Membraninsertion von *H. pylori* LysP (Abb. 17B) und Erhöhung der Proteinmenge dieses LysP-Orthologs (mit Überproduktion; Abb. 17A) keine Komplementation der *lysP*-Deletion von *E. coli* EPCD4 erzielt werden konnte, deutet auf fehlende Interaktion dieses Orthologs mit *E. coli* CadC. Demnach repräsentiert *H. pylori* LysP das einzige getestete LysP-Ortholog, das für die Konstruktion der oben beschriebenen Transporterchimären in Frage kommt.

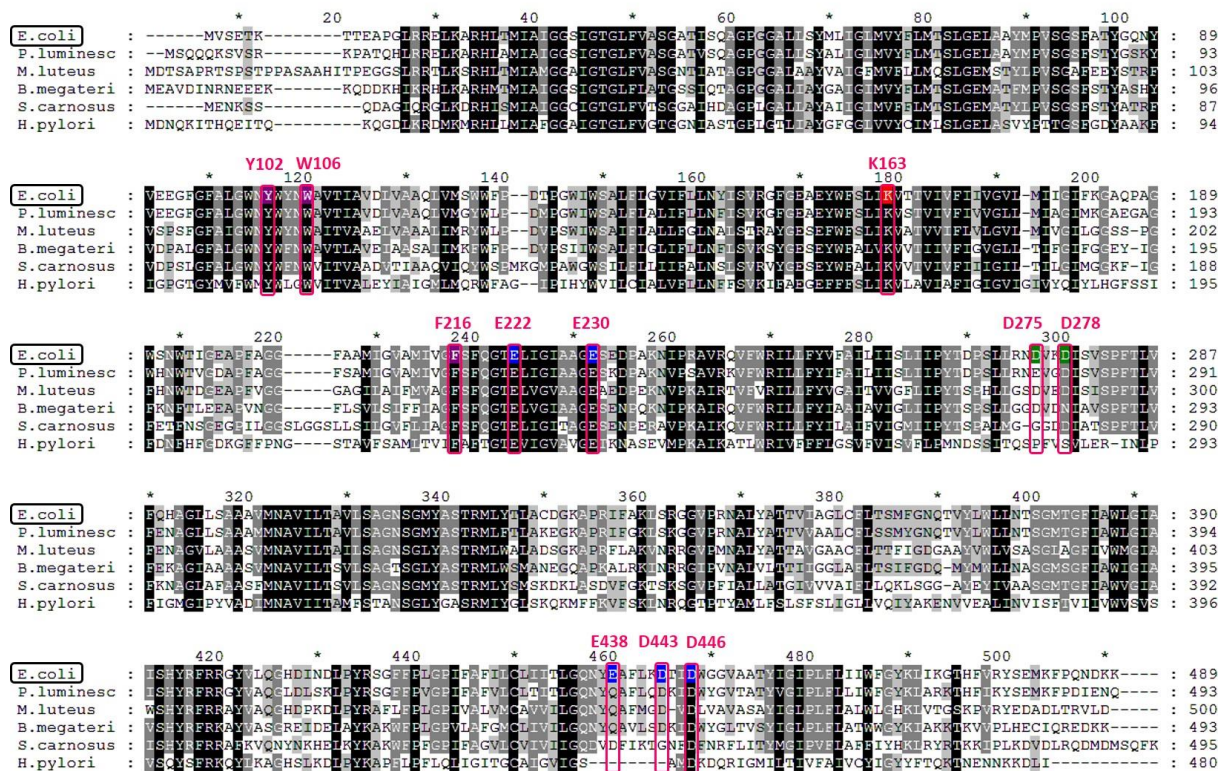


Abb. 18: Computergestützter Sequenzvergleich von LysP-Orthologen aus *Escherichia coli* (*E.coli*), *Photorhabdus luminescens* (*P.luminesc*), *Micrococcus luteus* (*M.luteus*), *Bacillus megaterium* (*B.megateri*), *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* (*S.carnosus*) und *Helicobacter pylori* P12 (*H.pylori*) mittels CLUSTALW2 (Larkin *et al.*, 2007) und GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997). Alle durch zielgerichtete Mutagenese identifizierten Aminosäurepositionen in LysP von *E. coli*, die für die Regulations- und Transportfunktion essentiell sind, sind im Sequenzalignement hervorgehoben. Die farblichen Markierungen entsprechen dem Farbschema in Abb. 15.

Der Vergleich der Sequenzen aller getesteter LysP-Orthologen zeigt, dass die Aminosäurepositionen Y102, W106, F216, K163, E222, E230 und D446, die als essentiell für die konformationell-getriggerte Weiterleitung des Lysin-Signals von *E. coli* LysP zu CadC identifiziert wurden, konserviert vorliegen (Abb. 18; identische Aminosäuren in 100% der Sequenzen). Den Positionen E438 und D443 in *E. coli* LysP, deren Austausch in LysP-Varianten mit fixierten nicht-inhibitorischen Signalzuständen resultierte (siehe 5.3.2), entsprechen nur in mindestens 60% der analysierten Sequenzen identische oder sehr verwandte Aminosäuren (Abb. 18). Interessanterweise weist ausschließlich die Sequenz von *H. pylori* LysP C-terminal eine Lücke von acht Aminosäuren auf, die die korrespondierenden Positionen zu LysP-E438 und -D443, umfasst (Abb. 18). Die fehlende Interaktion von *H. pylori* LysP mit *E. coli* CadC spricht diesen beiden Aminosäurepositionen eine (noch unbekannte) Rolle bei der Bildung der *E. coli* CadC/LysP-Komplexe zu.

Basierend auf dem Sequenzvergleich (Abb. 18) und den Resultaten der heterologen Expression (Abb. 17) kann festgehalten werden, dass an den Positionen, die den potentiellen periplasmatischen Kontaktstellen D275 und D278 in *E. coli* LysP entsprechen, als Voraussetzung für eine Lysin-abhängige Regulation bzw. Interaktion von/mit CadC mindestens eine negativ geladene Aminosäure (Asp oder Glu) vorhanden sein muss. Für *E. coli* LysP wurde gezeigt, dass ein Asp (D275 oder D278) in der periplasmatischen Schleife 4 bereits ausreicht, um eine Interaktion mit CadC zu gewährleisten (siehe 5.3.2). Die Beobachtung, dass nur im Falle von *H. pylori* LysP an den korrespondierenden Positionen keine negativ geladenen Aminosäuren lokalisiert sind (Abb. 18), impliziert, dass das Ausbleiben der Hemmung von *E. coli* CadC potentiell im Fehlen dieser polaren Aminosäuren begründet ist. Dies bekräftigt die funktionale Signifikanz der beiden negativ geladenen periplasmatischen Aminosäuren (D275 und D278) als Kontaktstellen innerhalb der heterooligomeren Grenzfläche zwischen CadC und LysP. Ist diese „Minimalausstattung“ in einer LysP(-Orthologen)-Sequenz zu finden, so kann unter Berücksichtigung der Einstellung der adäquaten Proteinmenge auch ohne simultane Existenz eines CadC-Orthologs im entsprechenden Genom die *lysP*-Deletion in *E. coli* EPCD4 durch heterologe Expression der alternativen LysP-Proteine kompensiert werden.

5.5 Identifikation von periplasmatischen Kontaktstellen in CadC involviert in die Interaktion mit LysP

Da elektrostatische Wechselwirkungen zur Stabilität und Spezifität von Interaktionen von Untereinheiten innerhalb homooligomerer Komplexe beitragen (Ali & Imperiali, 2005, Binter

et al., 2009) wurde die strukturell definierte elektrostatische Oberfläche von CadC_{PD} (Eichinger *et al.*, 2011) hinsichtlich potentieller positiv geladenener Interaktionsbereiche/-partner für Asp275 und Asp278 von LysP analysiert. Interessanterweise wurde so in der N-terminalen Subdomäne 1 der CadC_{PD} eine positiv geladene Region identifiziert, die die beiden exponierten Arginine an Position 265 und 268 beinhaltet (Abb. 19).

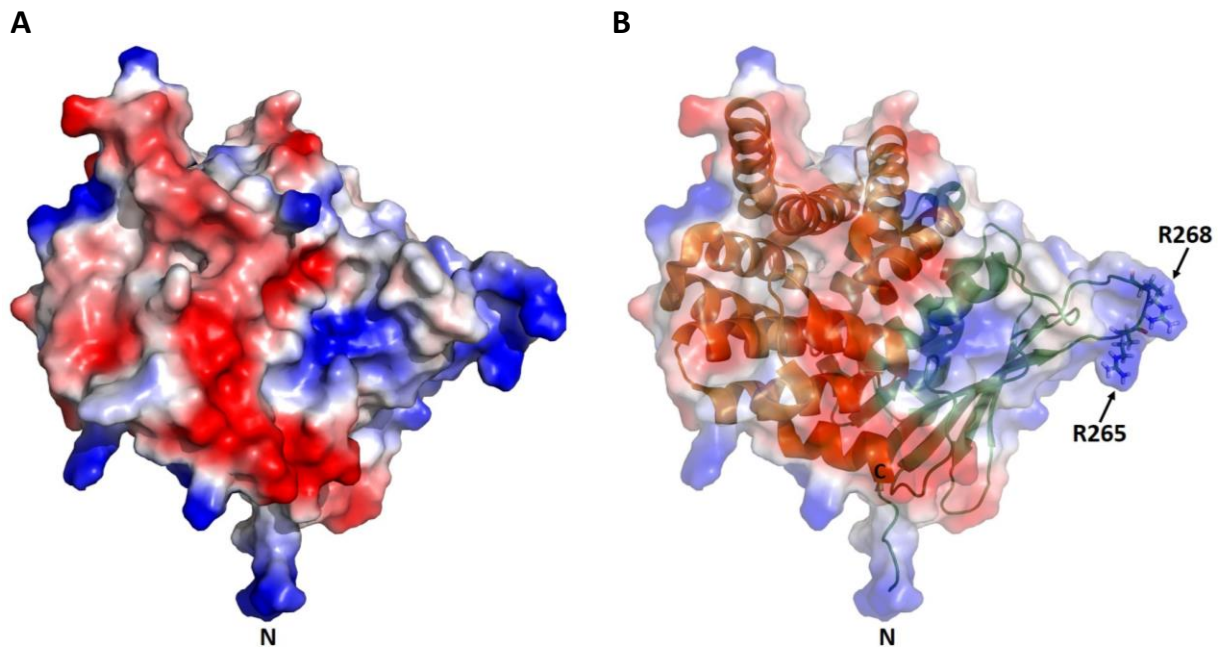


Abb. 19: Lokalisation von Arg265 und Arg268 innerhalb der dreidimensionalen Struktur der periplasmatischen Domäne von CadC. A. Elektrostatisches Oberflächenmodell von CadC_{PD}. Der N-Terminus weist in Richtung Zytoplasmamembran und setzt sich in die TM-Domäne von CadC fort (Eichinger *et al.*, 2011). Rot markiert sind Proteinbereiche, die negativ geladen sind und blaue Markierungen kennzeichnen positiv geladene Sektionen. B. Tertiärstruktur von CadC_{PD}. CadC_{PD} besteht aus einer N-terminalen Subdomäne 1 (grüne Markierung) und einer C-terminalen Subdomäne 2 (orange Markierung). Arg265 und Arg268 befinden sich in Subdomäne 1. N, N-Terminus von CadC_{PD}; C, C-Terminus von CadC_{PD}.

Eine CadC-Variante ohne diese beiden positiv geladenen Seitenketten (CadC-R265Q_R268Q) bedingte ein Lysin-unabhängiges, aber pH-reguliertes Expressionsmuster von *cadBA* (Abb. 20A), obwohl die eingeführten Mutationen die Biosynthese und Membranintegration der CadC-Variante nicht beeinträchtigten (Abb. 20B). Diese Beobachtung bestätigt die Notwendigkeit beider Arginine für die Interaktion zwischen CadC und LysP und impliziert, dass neben intramembranen Wechselwirkungen die Bildung von periplasmatischen Salzbrücken und/oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen CadC-

R265/R268 und LysP-D275/D278 die Heterooligomerisierung zwischen Sensor und Trigger-Transporter vermittelt und/oder stabilisiert.

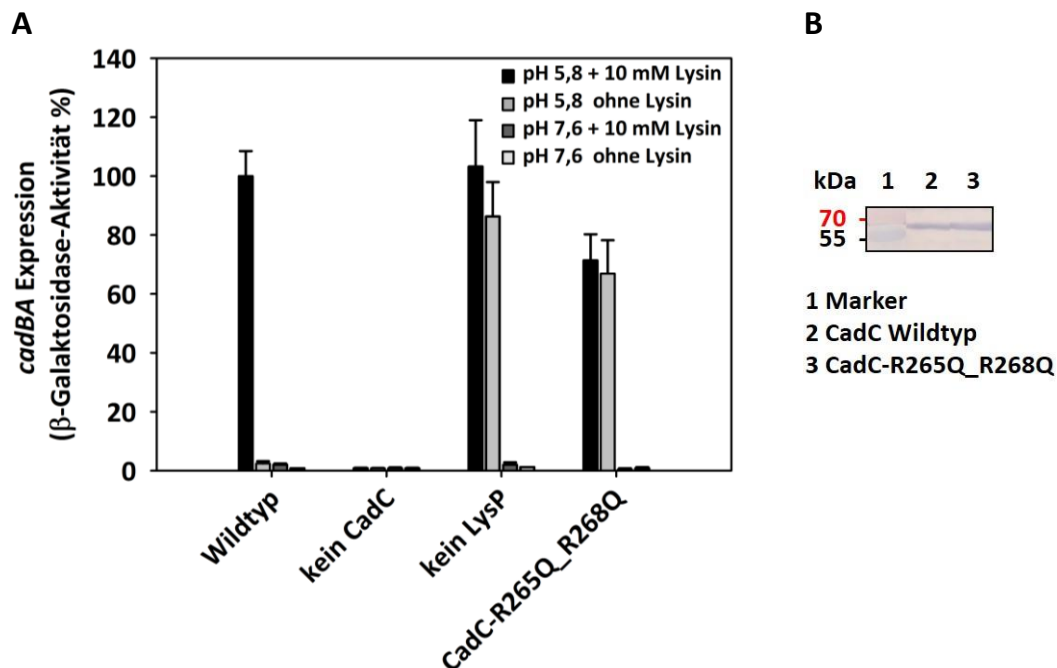


Abb. 20: Arg265 und Arg268 in Subdomäne 1 von CadC_{PD} sind essentiell für die Lysinabhängigkeit der *cadBA* Expression. A. Reportergenstudien wurden mit *E. coli* EPCD4 nach Co-Transformation mit Plasmid-kodiertem Wildtyp LysP (pBAD33) und Wildtyp CadC bzw. CadC-R265Q_R268Q (pET16b) durchgeführt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 unter Mikroaerobiose in KE-Minimalmedium (pH 5,8 oder pH 7,6, mit oder ohne 10 mM Lysin). Die bestimmten β-Galaktosidase-Aktivitäten dienten als Maß für die *cadBA* Expression (Miller, 1992). Die Enzymaktivitäten sind in Prozent bezogen auf den Durchschnittswert für Wildtyp CadC in Gegenwart von pH 5,8 und 10 mM Lysin (269 Miller Units) angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, die sich aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. B. Die Produktion und Integration von CadC-R265Q_R268Q in die Zytoplasmamembran von *E. coli* BL21(DE3)Δ*cadC* wurde mittels Western Blot-Analysen untersucht. Primärer Antikörper: Penta-His-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000).

Der Proteinbereich um Arg265 in Subdomäne 1 von CadC_{PD} wurde bereits in früheren Studien als funktional signifikant für die Detektion des Lysinsignals beschrieben (Dell *et al.*, 1994, Neely *et al.*, 1994). Allerdings wiesen alle mittels ungerichteter Mutagenese generierten CadC-Varianten Aminosäuresubstitutionen auf, die die entsprechenden Seitenketten drastisch veränderten: CadC-R265C (Neely *et al.*, 1994), CadC-N263K und CadC-Q266P (Dell *et al.*, 1994). Diese gravierenden Modifikationen lassen den Schluss zu, dass nicht die Austausche per se die Sensierung des Lysinsignals stören, sondern dass die eingeführten Aminosäuren weiträumige strukturelle und konformationelle Änderungen von CadC zur Folge haben, die

sich indirekt negativ auf die Detektion des Lysinsignals auswirken. Diese Hypothese wurde bereits von Tetsch *et al.* im Hinblick auf die CadC-Variante CadC-R265Q durch eine detaillierte Mutagenesestudie bestätigt (Tetsch *et al.*, 2008). Um zu überprüfen, ob es sich nun im Falle von N263 und Q266 in CadC um potentielle Kontaktstellen für LysP handelt, wurden diese Aminosäuren im Rahmen der vorliegenden Arbeit gegen konservative Reste ausgetauscht (CadC-N263K und CadC-Q266N). Beide CadC-Varianten wurden in die Zytoplasmamembran inseriert (Abb. 21B) und induzierten die Expression der Zielgene wie der Wildtyp (Abb. 21A).

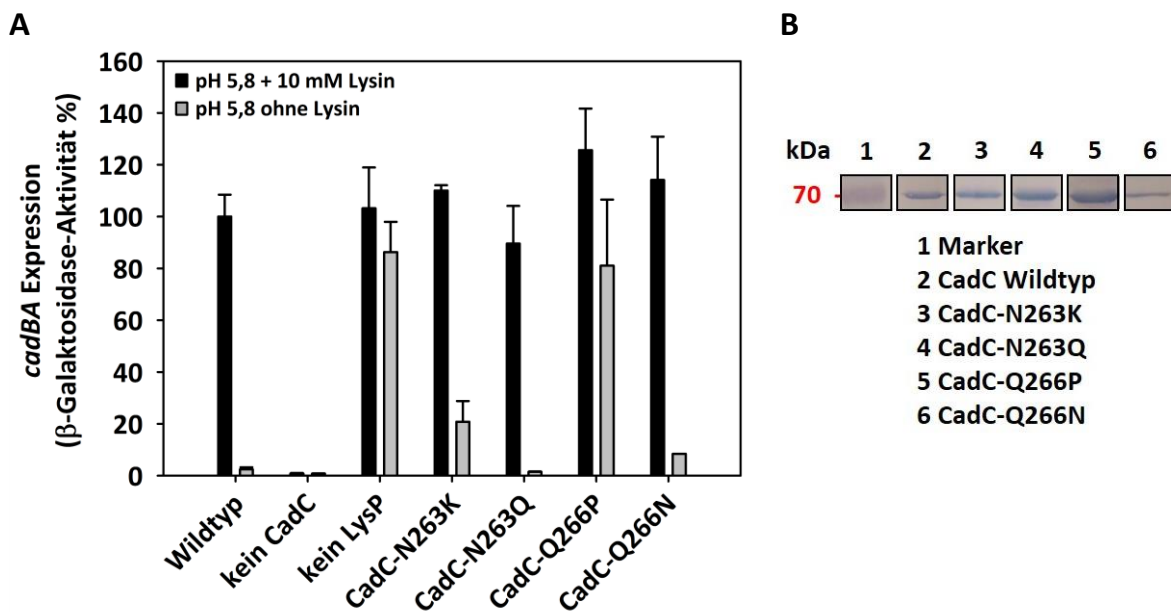


Abb. 21: Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in Subdomäne 1 von CadC_{PD} auf die *cadBA* Expression.

A. Reportergermanalysen wurden in Analogie zur detaillierten Beschreibung in Legende von Abb. 20 ausgeführt. B. Der immunologische Nachweis der Produktion und Membraninsertion der aufgelisteten CadC-Varianten erfolgte entsprechend der Beschreibung in Legende von Abb. 20.

Nur CadC-N263K und CadC-Q266P (Dell *et al.*, 1994) bedingten in Analogie zu CadC-R265C (Neely *et al.*, 1994, Tetsch *et al.*, 2008) einen Lysin-unabhängigen Phänotyp ohne in Biosynthese und Membranintegration gestört zu sein (Abb. 21). Folglich sind weitreichende Konformationsänderungen von CadC basierend auf den korrespondierenden drastischen Aminosäuresubstitutionen (CadC-N263K und CadC-Q266P) Ursache für die Defekte in der Lysin-Co-Sensorik. Im Hinblick auf diese Beobachtungen scheint nur die simultane Entfernung der positiv geladenen Seitenketten von R265 und R268 in Subdomäne 1 (siehe Abb. 20) zur Lysinunabhängigkeit der *cadBA* Expression zu führen, während die Einfach-Substitution von CadC-R265 (CadC-R265Q) keinen Effekt mit sich bringt (Tetsch *et al.*,

2008). Im Falle von CadC-R265Q scheinen die potentiellen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der verbleibenden positiv geladenen Seitenkette von CadC-R268 und LysP-D275/D278 für eine unbeeinträchtigte Lysin-Co-Sensorik (bzw. CadC/LysP-Interaktion) verantwortlich zu sein.

5.6 Analyse der Rolle des zellulären LysP-Moleküllevels in der Lysin-Co-Sensorik

Zahlreiche experimentelle Befunde implizieren eine Korrelation zwischen den zellulären CadC/LysP-Molekülmengen und einer adäquaten CadC-vermittelten Stressantwort [(Neely *et al.*, 1994, Tetsch *et al.*, 2008, Ude *et al.*, 2013), siehe 5.3.5]. Darüber hinaus zeigten Neely *et al.* und Ruiz *et al.*, dass die Expression von *lysP* durch externes Lysin reprimiert wird, aber nicht unter dem Einfluss von variierenden pH-Werten steht (Neely & Olson, 1996, Ruiz *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass Lysin neben der Rolle als direkter Stimulus im Zuge der konformationellen Hemmung (siehe 5.2.2 und 5.3.2) eine zusätzliche reprimierende Funktion im Rahmen der Endprodukthemmung der *lysP* Expression ausübt, um so durch eine Verminderung des zellulären LysP-Levels in Gegenwart von Lysin den inhibierenden Effekt von LysP auf CadC zu eliminieren („LysP-Ausdünnungseffekt“).

Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde die CadC/LysP-Ratio in Abhängigkeit von Lysin und/oder pH mittels quantitativem Western Blot analysiert. Die immunologische Detektion von CadC in präparierten Membranvesikeln von *E. coli* MG-MR1 (*lysP*::*egfp*) erfolgte mittels CadC-spezifischer Antikörper (~58 kDa, Abb. 22). LysP wurde basierend auf dem chromosomalen translationalen C-terminalen Tagging mit dem promotorlosen eGFP (LysP-eGFP-Fusionsprotein) durch Anti-GFP Antikörper nachgewiesen (~81 kDa, Abb. 22). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *E. coli* MG-MR1 zeigte, dass das LysP-eGFP-Fusionsprotein synthetisiert und in homogener Verteilung in die Zytoplasmamembran inseriert wurde (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde LysP-eGFP in der Western Blot-Analyse ausschließlich in den Membranfraktionen detektiert (Abb. 22B). Die Quantifizierung der Proteinlevel erfolgte mittels der Software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Die Kopienanzahl von CadC-Proteinen lag unabhängig von den getesteten externen Bedingungen bei 1-4 Molekülen pro Zelle (Abb. 22A), während für LysP 8-12 Kopien ebenfalls unabhängig von den Parametern pH und Lysin ermittelt wurden (Abb. 22B). Diese bestimmten Mengen implizieren das Vorhandensein von 1-2 CadC-Dimeren und 4-6 LysP-Dimeren bzw. 2-3 LysP-Tetrameren pro Zelle. Der LysP-Oligomerisierungsgrad

muss allerdings noch in zukünftigen Experimenten analysiert werden, da mittels BACTH leider keine Aussage darüber getroffen werden konnte (siehe 5.2.4).

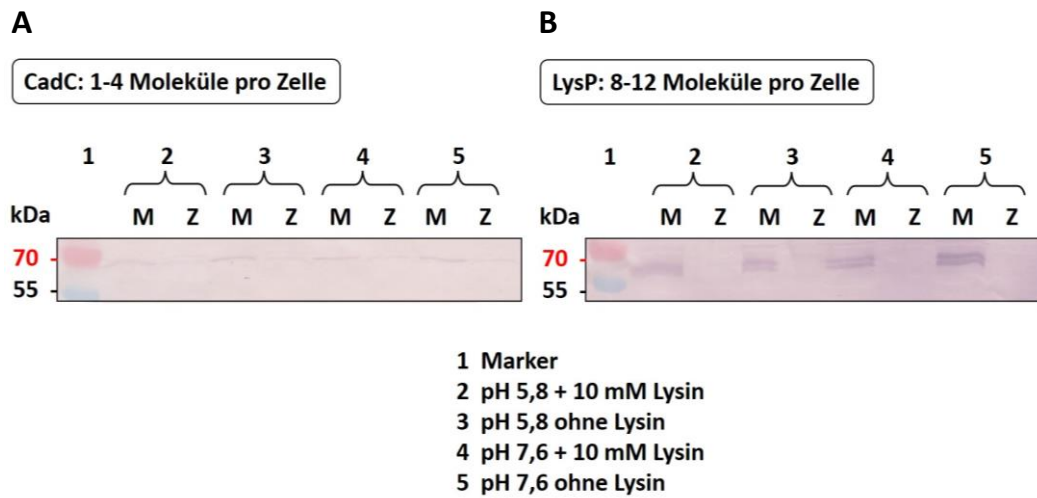


Abb 22: Western Blot-Analyse für die Quantifizierung der zellulären CadC- und LysP-Level in Abhängigkeit von externem pH und Lysin. *E. coli* MG-MR1 Zellen wurden nach aerober Kultivierung in KE-Minimalmedium (pH 7,6 ohne Lysin) in folgenden Minimalmedien aufgenommen und eine Stunde mikroanaerob kultiviert: 1) pH 5,8 + 10 mM Lysin, 2) pH 5,8 ohne Lysin, 3) pH 7,6 + 10 mM Lysin, 4) pH 7,6 ohne Lysin. Nach Präparation der Membranvesikel und der Zytosolfraction wurden pro Bande je 200 µg Gesamtprotein aufgetragen. A. Detektion von CadC: Primärer Antikörper: Präabsorbierter Rabbit Anti-CadC Antikörper (1:10.000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (1:2500). B. Detektion von LysP: Primärer Antikörper: Anti-GFP-Maus-IgG-Antikörper (1:1000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000). Die Quantifizierung wurde mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt (Schneider *et al.*, 2012). M, Membranfraktion; Z, Zytosol.

Die beobachtete Lysinunabhängigkeit des LysP-Proteinlevels ist im Einklang mit neuesten Resultaten von Lassak *et al.* (unveröffentlichte Daten), die LysP als sehr stabiles Membranprotein identifizierten und demnach in Ermangelung des oben postulierten „LysP-Ausdünnungseffektes“ (trotz Lysin-abhängiger Repression der *lysP* Expression) gegen die Hypothese der Aufhebung der LysP-vermittelten CadC-Hemmung sprechen, die auf der Verringerung des LysP-Levels in Gegenwart von Lysin basiert. Folglich scheint unter Cad-induzierenden Bedingungen die Auflösung der LysP-abhängigen Repression der CadC-Aktivität ausschließlich auf i) Lysin-abhängigen Konformationsänderungen (nach Bindung und/oder Transport von Lysin) von LysP, die in der Abschwächung der PPI zwischen Sensor und Transporter resultieren (konformationelle Hemmung, siehe 5.2.2 und 5.3.2) und ii) auf

der pH-abhängigen zusätzlichen Aufhebung von periplasmatischen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen CadC und LysP (siehe 5.3.4 und 5.5) zu beruhen.

5.7 Funktionale Charakterisierung von LysP

5.7.1 LysP fungiert als L-Lysin-spezifischer hochaffiner Transporter

Für das Verständnis des molekularen Mechanismus des Zusammenspiels von LysP und CadC ist eine umfassende Charakterisierung der Transportaktivität von LysP unabdingbar. Daher wurde für die *in vivo* Analyse der Transportcharakteristika von Wildtyp LysP der *E. coli* Stamm JWCD247 konstruiert, der Deletionen aller Lysin-Transportsysteme trägt. Die Komplementation dieses Stammes mit Plasmid-kodiertem Wildtyp LysP (pBAD33-*lysP*) resultierte in einer typischen Michaelis-Menten-Aufnahmekinetik mit einer initialen Transportrate von $10,5 \text{ nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ (Abb. 23A).

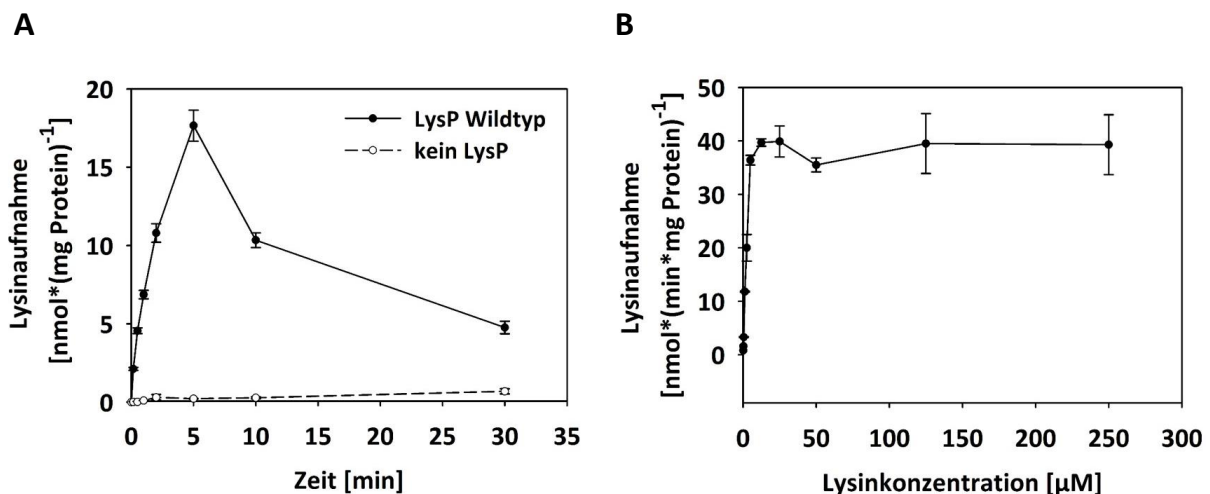


Abb. 23: Zeit- und Lysinkonzentrations-abhängige LysP-vermittelte Lysinaufnahme in *E. coli* JWCD247.

A. Zeitabhängige Lysinaufnahme. Die Aufnahme von L- ^{14}C Lysin (finale Endkonzentration: $10 \mu\text{M}$) durch *E. coli* JWCD247 nach Komplementation mit pBAD33-*lysP* (LysP Wildtyp) oder pBAD33 (kein LysP) wurde in Gegenwart von 20 mM D-Laktat (Na^+ -Salz) als Elektronendonator bei 25°C unter aeroben Bedingungen unter der Verwendung einer Schnell-Filtrations-Methode bestimmt. Die Transportreaktionen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgestoppt. Die Standardabweichungen errechnen sich aus drei unabhängigen Experimenten. B. Lysinaufnahme-Kinetik. Die Aufnahme von L- ^{14}C Lysin durch *E. coli* JWCD247 nach Komplementation mit pBAD33-*lysP* wurde in Gegenwart von 20 mM D-Laktat (Na^+ -Salz) als Elektronendonator in Gegenwart von Lysinkonzentrationen von $0,125 \mu\text{M}$ bis $250 \mu\text{M}$ gemessen. Die Transportreaktionen wurden jeweils nach 10 s abgestoppt. Die erhaltenen Daten sind gemäß Michaelis-Menten aufgetragen. Die Standardabweichungen errechnen sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Enzymkinetische Studien identifizierten LysP als hochaffine Permease ($K_{M(Lys)}$ -Wert = 2,5 μ M), die Lysin mit einer maximalen Geschwindigkeit (V_{max}) von 39,5 $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$ transportiert (Abb. 23B). JWCD247 Zellen, die mit pBAD33 ohne *lysP* (Kontrolle) komplementiert wurden, zeigten keine Aufnahme von L-[14 C]Lysin (Initialrate = 0,04 $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$, Abb. 23A).

Um Aussagen über die Spezifität von LysP machen zu können, wurde der Effekt von ausgewählten L-Aminosäuren, Polyaminen und Lysinanaloga auf den LysP-vermittelten Lysintransport analysiert (Abb. 24).

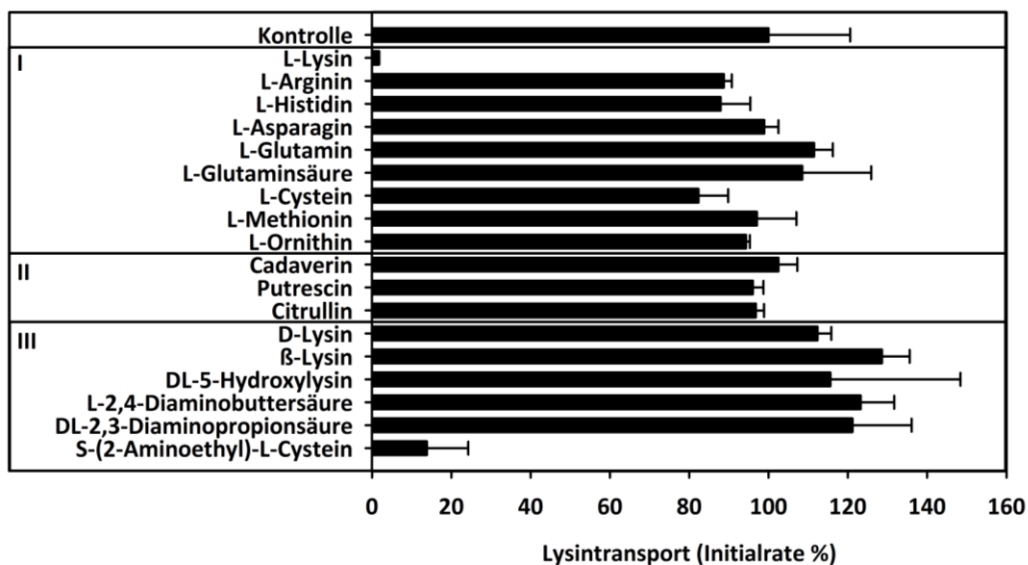


Abb. 24: Effekt von ausgewählten L-Aminosäuren (I), Polyaminen (II) und Lysinanaloga (III) auf den LysP-vermittelten Lysintransport. Die Aufnahme von L-[14 C]Lysin (finale Endkonzentration: 10 μ M) durch *E. coli* JWCD247 nach Komplementation mit pBAD33-*lysP* wurde in Gegenwart von 20 mM D-Laktat (Na^+ -Salz) als Elektronendonator bei 25°C unter aeroben Bedingungen unter der Verwendung einer Schnell-Filtrations-Methode bestimmt. Die nicht radioaktiven Testsubstrate wurden im 100-fachen Überschuss vor Start der Transportreaktion zugegeben (finale Endkonzentration: 1 mM). Als Kontrolle wurde die initiale Lysintransportrate ohne Zugabe einer potentiell hemmenden Substanz bestimmt. Die Initialraten sind in Prozent bezogen auf den Durchschnittswert der Kontrolle (kein Zusatz einer kompetitiven Testsubstanz) dargestellt. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Dieser Test beruht auf der potentiellen kompetitiven Hemmung der Lysinaufnahme durch Substrate, deren Import ebenfalls durch LysP katalysiert wird bzw. die in der Lage sind, an LysP zu binden. Die einzige Substanz, die eine signifikante Inhibition der Lysintransportrate bedingte, war das toxische Lysinanalogon Thiosin, das bereits in frühen Studien von Popkin und Maas und Tabor *et al.* als Substrat von LysP entdeckt wurde [(Popkin & Maas, 1980, Tabor *et al.*, 1980), Abb. 24]. Im Vergleich zum LysP-Ortholog STM2200 aus *S.*

typhimurium, für das in vitro mittels ITC (engl. isothermal titration calorimetry)-Messungen eine Bindung von D-Lysin ermittelt wurde (Kaur *et al.*, 2013), konnte im Falle von *E. coli* LysP keine kompetitive Inhibition der Lysinaufnahme durch Zugabe von D-Lysin beobachtet werden (Abb. 24). Allerdings ist die Bindung von D-Lysin durch STM2200 45x schwächer ausgeprägt als die der L-chiralen Form (Kaur *et al.*, 2013). Der vorliegenden Spezifitätsanalyse zur Folge arbeitet LysP von *E. coli* als L-Lysin-spezifisches Transportsystem.

Der Transport-hemmende Effekt von Entkopplern [Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP)] und Inhibitoren (Kaliumcyanid) der Atmungskette auf LysP, deren Transport-interferierende Funktionen durch zahlreiche Beispiele in der Literatur belegt sind, impliziert eine Abhängigkeit des LysP-vermittelten Lysintransportes von dem elektrochemischen Protonenpotential über der Zytoplasmamembran $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (Abb. 25).

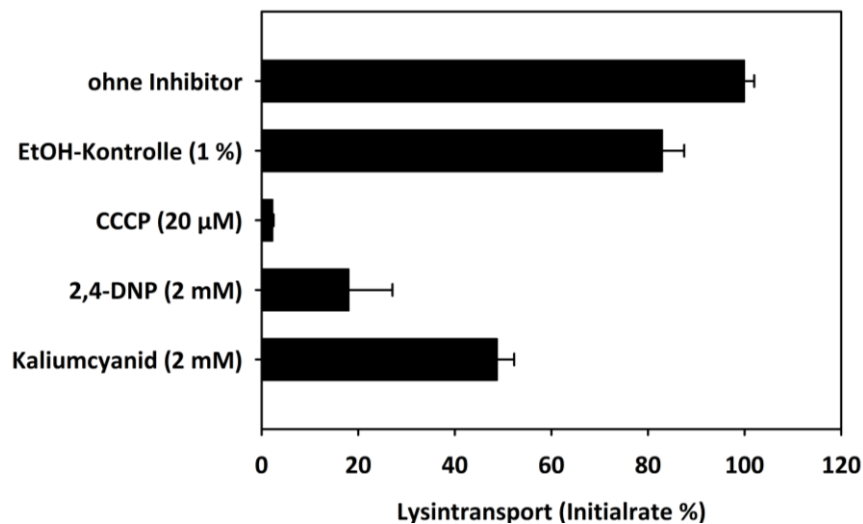


Abb. 25: Effekt von Inhibitoren und Entkopplern auf den LysP-vermittelten Lysintransport (Inhibitoranalyse). Vor Start der Transportreaktion wurden Zellen von *E. coli* JWCD247, komplementiert mit pBAD33-*lysP*, mit den aufgelisteten Inhibitoren in unterschiedlichen Endkonzentrationen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Mendz *et al.*, 1998). Die Aufnahme von L-[¹⁴C]Lysin (finale Endkonzentration: 10 µM) wurde bei 25°C unter aeroben Bedingungen unter der Verwendung einer Schnell-Filtrations-Methode bestimmt. Die Initialraten sind in Prozent bezogen auf den Durchschnittswert der Kontrolle (ohne Inhibitor) dargestellt. Die Standardabweichung errechnet sich aus drei unabhängigen Experimenten. Die EtOH-Kontrolle (1 %) wurde durchgeführt, da CCCP in absoluten Ethanol gelöst wurde. Die Verdünnung dieser Stocklösung in Tris/Mes-Puffer (pH 7,6, 5 mM MgCl₂) garantierte eine finale EtOH-Konzentration in der Zellsuspension von weniger als 1%.

Diese thermodynamische Größe setzt sich aus einer elektrischen und chemischen Komponente gemäß folgender Gleichung zusammen:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\Psi - [(2,3 \cdot R \cdot T) \cdot F^{-1}] \cdot \Delta\text{pH};$$

$$\text{wobei } [(2,3 \cdot R \cdot T) \cdot F^{-1}] = \sim 59 \text{ mV};$$

Dabei repräsentiert $\Delta\Psi$ das elektrische Potential über der Zytoplasmamembran und ΔpH die chemische Differenz der Protonenkonzentration (Ramos *et al.*, 1976). Basierend auf dieser *in vivo* Inhibitoranalyse konnte nicht spezifiziert werden, welche dieser beiden Komponenten ($\Delta\Psi$ oder ΔpH) als (Haupt-)Triebkraft für die LysP-vermittelte Lysinaufnahme agiert.

5.7.2 Eigenschaften von LysP in Proteoliposomen

5.7.2.1 Reinigung und (Co-)Rekonstitution von LysP und LysP/CadC

Für die detaillierte biochemische *in vitro* Analyse (i) des Transportmodus und der Triebkräfte der durch LysP katalysierten Transportreaktion und (ii) des Effektes von CadC auf den LysP-vermittelten Lysinimport wurden nach (zwei separaten) Überexpressionsansätzen von *lysP* und *cadC* mittels IPTG-abhängiger Induktion der T7 Promotoren von Plasmid pT-*lysP* (Tetsch *et al.*, 2008) und pET16b-*cadC2* (Küper & Jung, 2005) unter Verwendung des Überproduktionsstammes *E. coli* BL21(DE)pLysS und nach Solubilisierung der Membranproteine aus den Membranfraktionen dieses Stammes LysP-His₆ bzw. His₁₀-CadC mit Hilfe der Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 26 A, B) und in *E. coli* Phospholipide rekonstituiert.

So wurden ausgehend von 50 mg Gesamtmembranprotein ~3-4 mg gereinigtes LysP erhalten bzw. von 40 mg Gesamtmembranprotein ~0,6 mg gereinigtes CadC. Die Rekonstitution von LysP bzw. die Co-Rekonstitution von LysP/CadC erfolgte nach Inkubation der entsprechenden gereinigten Proteine mit Detergenz-destabilisierten Liposomen aus *E. coli* Phospholipiden durch die Detergenz-Entfernungsmethode nach Jung *et al.* (Jung *et al.*, 1998).
 LysP-Rekonstitution: Bei einem Lipid/Protein-Verhältnis von 100:1 (w/w) wurden ~58% des gereinigten und solubilisierten Proteins in die LysP-Proteoliposomen rekonstituiert.
 LysP/CadC-Rekonstitution: Bei einem Lipid/LysP/CadC-Verhältnis von 100:1:1,11 (w/w/w) wurden je ~51% des gereinigten und solubilisierten LysP bzw. CadC in die LysP-Proteoliposomen rekonstituiert. Anschließend Western Blot-Analyse diente zur visuellen

Kontrolle des Erfolgs der (Co-)Rekonstitution und zur Berechnung der prozentualen Anteile an CadC und LysP (essentiell für die spätere Kalkulation der Transportaktivität, Abb. 26C).

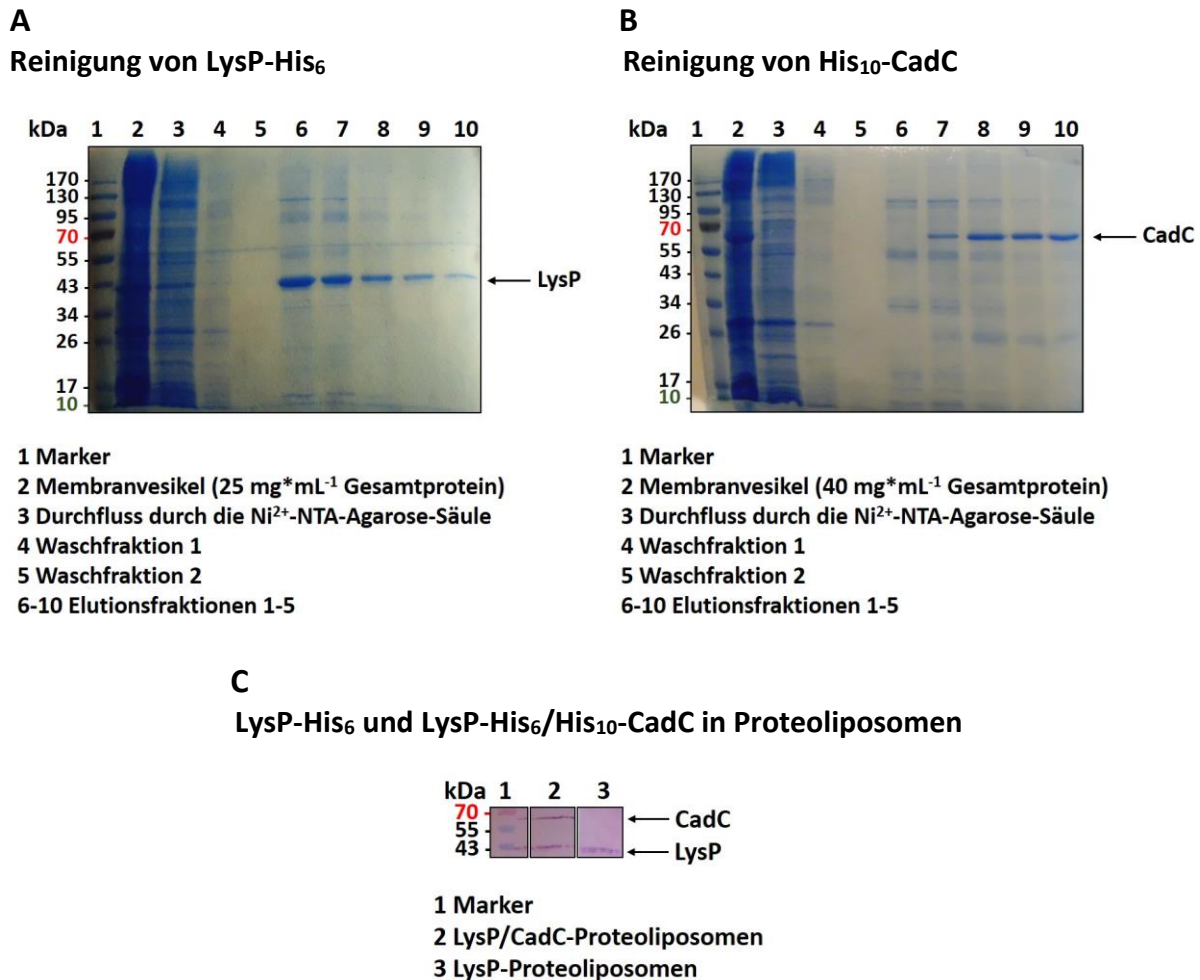


Abb. 26: Reinigung von LysP-His₆ (A) und His₁₀-CadC (B) durch Ni^{2+} -Chelat-Affinitätschromatographie und Rekonstitution in *E. coli* Phospholipide (C). A. und B. Proteinproben von verschiedenen Stufen der Reinigungsprozedur wurden mittels SDS-12,5% Polyacrylamidgele aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Pro Spur wurden je 10 μL der entsprechenden Probe aufgetragen. C. Die Rekonstitution von LysP-His₆ bzw. die Co-Rekonstitution von LysP-His₆ und His₁₀-CadC in *E. coli* Phospholipide wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft. Primärer Antikörper: Penta-His-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000); Sekundärer Antikörper: Alkalische Phosphatase-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000).

5.7.2.2 In vitro Charakterisierung von LysP

Die Funktion von isoliertem und (co-)rekonstituiertem LysP bzw. LysP/CadC wurde mit Hilfe der Aufnahme und Akkumulation von L-[^{14}C]Lysin in die LysP- bzw. LysP/CadC-Proteoliposomen analysiert. Die Generierung eines Membranpotentials ($\Delta\Psi$) und elektrochemischer Ionengradienten über der Proteoliposomenmembran wurde mittels einem

nach außen gerichteten (innen negativen) K^+ -Diffusionsgradienten in der Gegenwart des K^+ -Ionophors Valinomycin und durch Veränderung der Ionenkomponenten und/oder des pH-Wertes der korrespondierenden Verdünnungspuffer erzielt.

Die Einstellung eines Membranpotentials ($\Delta\Psi = -153,52$ mV, $pH_{\text{innen}} 7,6$, $pH_{\text{außen}} 7,6$) hatte die höchste maximale Lysinakkumulation zur Folge, während in der Abwesenheit jeglicher Triebkraft (Kontrolle: kein $\Delta\Psi$, kein ΔpH , kein Ionengradient) keine signifikante Lysinakkumulation zu beobachten war (Abb. 27A). Durch Experimente mit variierenden, durch unterschiedliche externe K^+ -Konzentrationen und durch Zugabe von Valinomycin generierten, K^+ -Diffusionspotentialen (Nernst-Potentiale, innen negativ, $pH_{\text{innen}} 7,6$, $pH_{\text{außen}} 7,6$) wurde zwischen dem Lysintransport und $\Delta\Psi$ eine lineare Abhängigkeit identifiziert: Je negativer $\Delta\Psi$, desto höher die maximale Lysinakkumulation (Abb. 28). Gleiche K^+ -Konzentrationen auf beiden Seiten der Proteoliposomenmembran ($\Delta\Psi = 0$ mV) hatten keine Akkumulation von $L-[^{14}C]$ Lysin zur Folge (Abb. 28). Die Korrelation zwischen $\Delta\Psi$ (innen negativ) und der Transportaktivität impliziert eine LysP-vermittelte Katalyse eines elektrogenen Transportvorgangs mit einer Nettoladungsverschiebung. Im Hinblick auf die pK_s -Werte der Aminogruppen von Lysin ($pK_{COO^-} = 2,20$, $pK_{\alpha-NH^{3+}} = 8,90$, $pK_{\epsilon-NH^{3+}} = 10,28$) werden somit bei externem pH 7,6 zumindest (ohne Berücksichtigung möglicher Kopplungslionen) eine positive Ladung pro Lysin (Lys^+) transloziert. In Gegenwart von $\Delta\Psi$ konnten zusätzliche Na^+ - ($\Delta\mu_{Na^+}$) und Li^+ - ($\Delta\mu_{Li^+}$) Gradienten die Transportaktivität nicht steigern (Abb. 27A).

Ein elektrochemischer H^+ -Gradient ($\Delta\mu_{H^+}$, $pH_{\text{innen}}: 7,6$, $pH_{\text{außen}} 5,8$) resultierte trotz Präsenz der $\Delta\Psi$ -Komponente in einer deutlichen Verringerung der Lysinakkumulation, die durch einen zusätzlichen Na^+ -Gradienten nicht stimuliert wurde ($\Delta\mu_{H^+} + Na^+$, Abb. 27A). Das ermittelte pH-Profil ($\Delta\mu_{H^+}$, $pH_{\text{innen}} 7,6$, $pH_{\text{außen}} 5-9$) der LysP-Transportaktivität steht mit dieser Beobachtung der Inhibition durch niedrigen externen pH-Wert im Einklang: das pH-Optimum liegt bei $\sim 7,5-8,0$, während niedrigere pH-Werte (5-7) sowie alkalischere pH-Werte (ab pH $\sim 8,5$) einen hemmenden Effekt auf die maximale Lysinakkumulation ausübten (Abb. 29). Diese Abnahme der Transportaktivität bei niedrigen externen (und internen) pH-Werten ist ein bekanntes Phänomen bei Aminosäuretransportern (Bröer & Krämer, 1990).

In Relation zu der hohen maximalen Lysinakkumulation in Gegenwart von $\Delta\Psi$ (entspricht 100%) verursachte ein nach innen orientierter pH-Gradient (ΔpH , $pH_{\text{innen}} 7,6$, $pH_{\text{außen}} 5,8$; kein $\Delta\Psi$) eine signifikante Reduktion der maximalen Lysinakkumulation um $\sim 96\%$ (Abb. 27A). Diese Erniedrigung spiegelte sich auch in der verringerten initialen Transportrate wider ($231 \text{ nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$, Abb. 27C). Im Gegensatz zu der initialen Transportrate bei

ΔpH waren trotz deutlicher Unterschiede im Verlauf der katalysierten Transportreaktionen bei allen weiteren Testbedingungen ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$, $\Delta\Psi$, $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$, $\Delta\mu_{\text{Li}^+}$, $\Delta\mu_{\text{H}^+}+\text{Na}^+$) keine signifikanten Unterschiede der Initialraten zu erkennen (810, 705, 846, 843, 933 nmol*(min*mg Protein)⁻¹, Abb. 27C). Trotz Hemmung durch niedrigen pH zeigte LysP in Anwesenheit von ΔpH im Hinblick auf das Kontrollexperiment (Kontrolle: keine Triebkraft \rightarrow kein Transport (0 nmol*(mg Protein)⁻¹) eine deutliche maximale Lysinakkumulation (146,5 nmol*(mg Protein)⁻¹).

In weiteren in vitro Experimenten mit LysP-Proteoliposomen in 100 mM KPi , pH 5,8 konnten die bereits skizzierten Resultate der Versuche mit LysP-Proteoliposomen in 100 mM KPi , pH 7,6 bestätigt werden (Abb. 30): 1) $\Delta\Psi$ (innen negativ, pH_{innen} 5,8, $\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ 5,8) stimulierte die Lysinaufnahme. Der niedrige interne pH-Wert (5,8) bewirkte allerdings generell deutlich reduzierte Transportaktivitäten (\rightarrow Phänomen der Hemmung durch niedrigen pH). 2) Die Erhöhung des externen pH-Wertes resultierte in Gegenwart von $\Delta\Psi$ (innen negativ, entspricht $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, pH_{innen} 5,8, $\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ 7,6) in signifikant höheren Transportaktivitäten. 3) Ein nach außen gerichteter pH-Gradient (ΔpH , pH_{innen} 5,8, $\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ 7,6) führte zu keiner Lysinaufnahme.

Die auf den oben dargestellten in vitro Versuchen mit rekonstituiertem LysP basierte Identifikation von $\Delta\Psi$ mit physiologischer Polarität (innen negativ) und einem ebenfalls physiologisch nach innen orientiertem ΔpH (trotz der Transport-hemmenden Wirkung von niedrigem pH) als Triebkraft der Lysinaufnahme ist konsistent mit den Daten der in vivo Inhibitorstudie, die eine Abhängigkeit des LysP-vermittelten Lysintransportes von dem elektrochemischen Protonenpotential $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ impliziert (siehe 5.7.1). Die Abhängigkeit von LysP von Na^+ - und Li^+ -Gradienten konnte ausgeschlossen werden.

Da die vorliegende Arbeit auf die Analyse der regulatorischen Wechselwirkung zwischen LysP und CadC fokussiert, wurden beide Proteine co-rekonstituiert, um den möglichen Effekt von CadC auf die Transportaktivität von LysP zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Transportanalyse deuten darauf hin, dass Transportmodus und -rate von LysP nicht durch CadC beeinflusst werden, da LysP bei allen getesteten artifiziellen Gradienten über der LysP/CadC-Proteoliposomenmembran annähernd den LysP-Proteoliposomen entsprechende Transportaktivitäten aufwies (Abb. 27B). Ob es sich im Falle des co-rekonstituierten CadC um funktionales CadC handelte, konnte leider im Zuge dieses Versuchsansatzes nicht bestimmt werden.

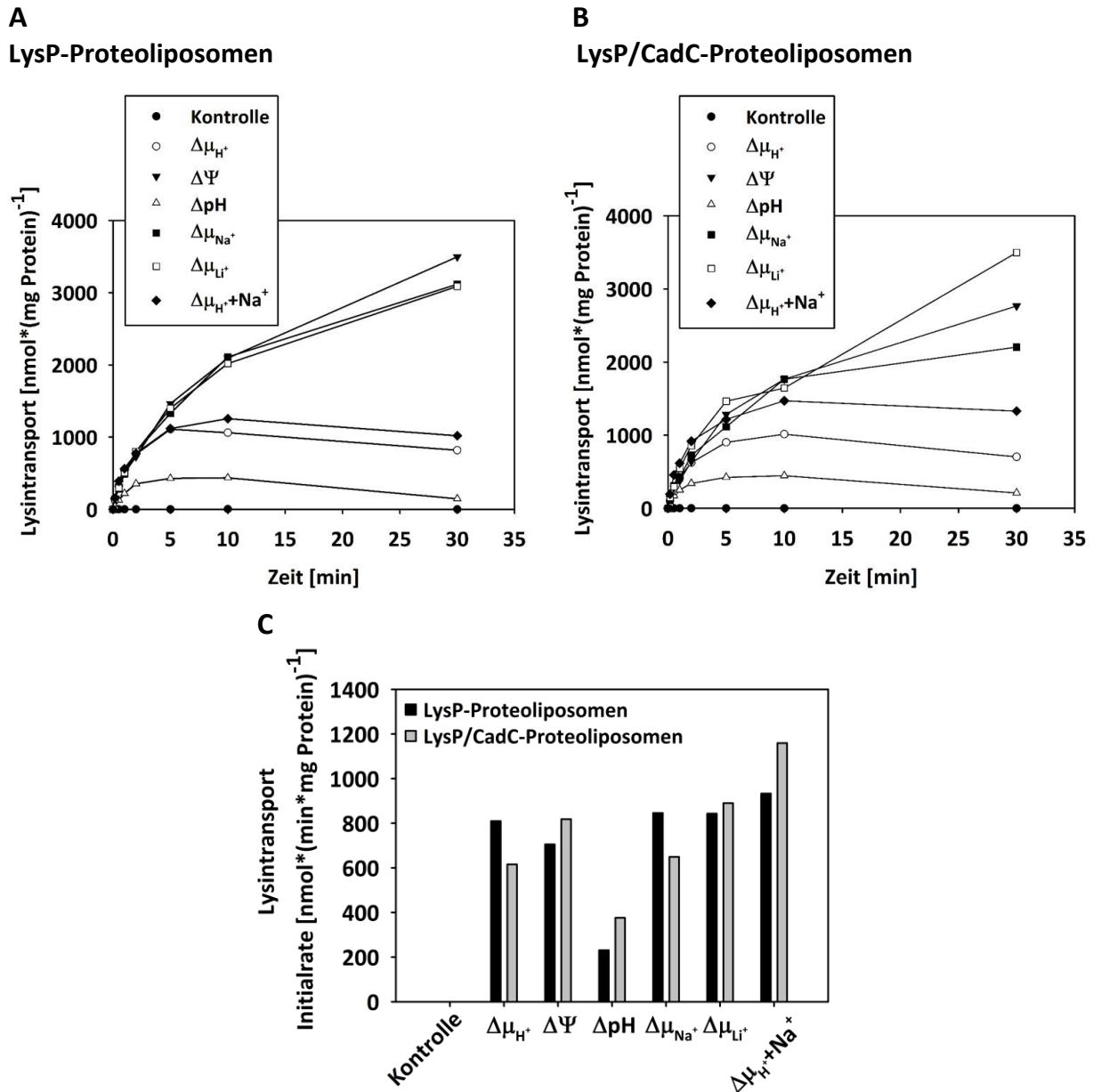


Abb. 27: Effekt von artifiziell erzeugten (Ionen-)Gradienten auf den LysP-vermittelten Lysintransport in Proteoliposomen (innen: 100 mM KPi, pH 7,6). Die Proteoliposomen (in 100 mM KPi, pH 7,6, 1 mg Protein \cdot mL $^{-1}$) wurden 400-fach verdünnt in: 1) 100 mM KPi, pH 7,6 (Kontrolle, schwarze Kreise), 2) 100 mM Tris/Mes, pH 5,8 ($\Delta\mu_{H^+}$, weiße Kreise), 3) 100 mM Tris/Mes, pH 5,8, supplementiert mit 50 mM NaCl ($\Delta\mu_{H^+} + Na^+$, schwarze Rauten), 4) 100 mM Tris/Mes, pH 7,6 ($\Delta\Psi$, schwarze Dreiecke), 5) 100 mM Tris/Mes, pH 7,6, supplementiert mit 50 mM NaCl ($\Delta\mu_{Na^+}$, schwarze Vierecke), 6) 100 mM Tris/Mes, pH 7,6, supplementiert mit 50 mM LiCl ($\Delta\mu_{Li^+}$, weiße Vierecke), 7) 100 mM KPi, pH 5,8 (ΔpH , weiße Dreiecke). Alle Reaktionspuffer wurden vor dem Start der Transportreaktion durch Zugabe der Proteoliposomen mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 μ M Valinomycin und 10 μ M L-[^{14}C]Lysin versetzt. Die Transportreaktionen wurden unter der Verwendung einer Schnell-Filtrations-Methode abgestoppt. A. Zeitabhängige L-[^{14}C]Lysin-Aufnahme in Proteoliposomen, die gereinigtes LysP enthalten (LysP-Proteoliposomen). B. Zeitabhängige L-[^{14}C]Lysin-Aufnahme in Proteoliposomen, die gereinigtes LysP und CadC enthalten (LysP/CadC-Proteoliposomen). C. Vergleich der initialen Transportraten (basierend auf den Zeitverläufen von A und B). Je Pufferkomposition (1-7) sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung dargestellt.

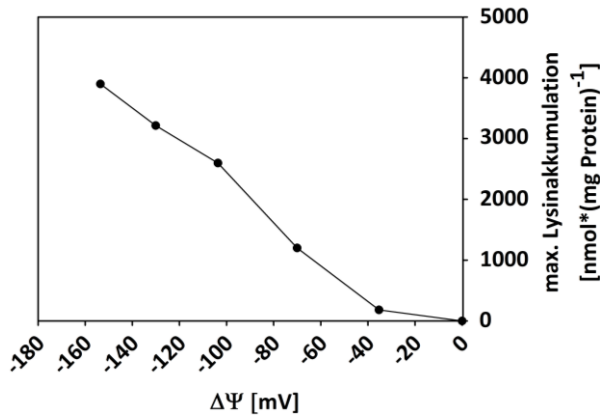


Abb. 28: Effekt von variierenden Kaliumdiffusionspotentialen ($\Delta\Psi$) auf die maximale Lysinakkumulation in LysP-Proteoliposomen.

Verschiedene $\Delta\Psi$ wurden durch theoretisch kalkulierte Volumina der 100 mM Tris/Mes- und 100 mM KPi -Pufferkomponenten (je pH 7,6), aus denen sich der jeweilige Transportreaktionsansatz zusammensetzte, generiert. Die Größe der Kaliumdiffusionspotentiale wurde mit Hilfe der Nernst-Gleichung berechnet. Die Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6, 1 mg Protein* mL^{-1}) wurden 400-fach in dem entsprechenden Puffermix, versetzt mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM MgCl_2 , 0,2 μM Valinomycin und 10 μM L- ^{14}C Lysin, verdünnt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

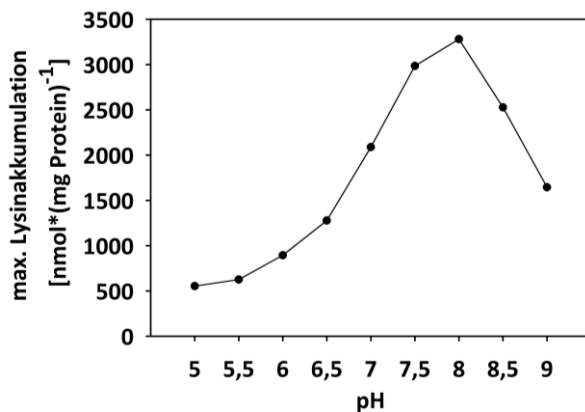


Abb. 29: Effekt von variierenden pH-Werten auf die maximale Lysinakkumulation in LysP-Proteoliposomen. Die Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6, 1 mg Protein* mL^{-1}) wurden 400-fach in 100 mM Tris/Mes, pH 5-9, versetzt mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM MgCl_2 , 0,2 μM Valinomycin und 10 μM L- ^{14}C Lysin, verdünnt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

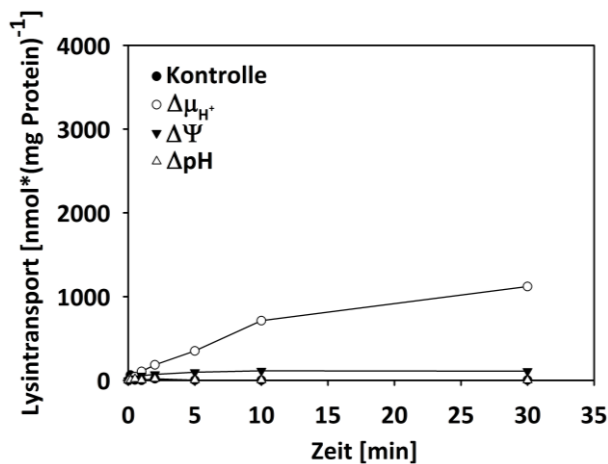


Abb. 30: Effekt von artifiziell erzeugten (Ionen-) Gradienten auf den LysP-vermittelten Lysintransport in Proteoliposomen (innen: 100 mM KPi , pH 5,8). Die Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 5,8, 1 mg Protein* mL^{-1}) wurden 400-fach verdünnt in: 1) 100 mM KPi , pH 5,8 (Kontrolle, schwarze Kreise), 2) 100 mM Tris/Mes, pH 7,6 ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$, weiße Kreise), 3) 100 mM Tris/Mes, pH 5,8 ($\Delta\Psi$, schwarze Dreiecke), 4) 100 mM KPi , pH 7,6 (ΔpH , weiße Dreiecke). Alle Reaktionspuffer wurden vor dem Start der Transportreaktion durch Zugabe der Proteoliposomen mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM MgCl_2 , 0,2 μM Valinomycin und 10 μM L- ^{14}C Lysin versetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Nach Vorladen der LysP-Proteoliposomen mit nicht-radioaktiven potentiellen Gegensubstraten, die im Hinblick auf das Cad-System von *E. coli* eine physiologische Rolle spielen (Lysin, β -Lysin, Cadaverin), hatte nur Lysin im Inneren der Proteoliposomen einen signifikanten stimulatorischen Einfluss auf den LysP-vermittelten Transport von L-[14 C]Lysin (Lysin-Counterflow, Abb. 31). Basierend auf diesen Austausch-Versuchen konnte eine mögliche Antiportfunktion für die getesteten Gegensubstrate von LysP ausgeschlossen werden.

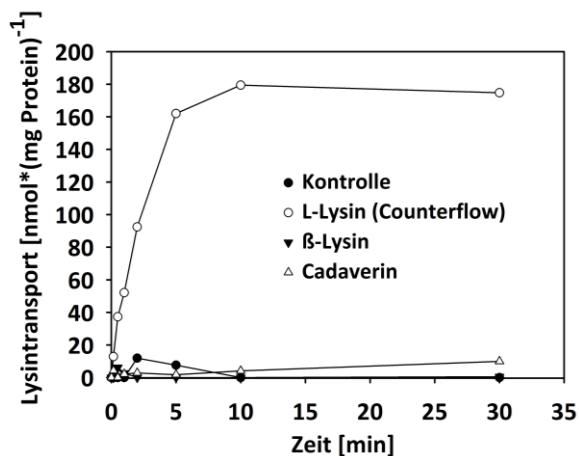


Abb. 31: Lysin Aufnahme in LysP-Proteoliposomen nach Vorladen mit Lysin, β -Lysin und Cadaverin (Counterflow- bzw. Antiportexperiment). Die Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6, 1 mg $\text{Protein} \cdot \text{mL}^{-1}$) wurden mit je 10 mM der entsprechenden nicht-radioaktiven Substanz äquilibriert. Aliquots (1 μL) dieser Proteoliposomen-suspension wurden dann in 400 μL 100 mM KPi , pH 7,6, versetzt mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM MgCl_2 und 10 μM L-[14 C]Lysin, verdünnt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

5.7.2.3 LysP: Lysin-Uniporter oder Lysin/ H^+ -Symporter?

Die in vitro Versuche mit rekonstituiertem LysP (siehe 5.7.2.2) identifizierten $\Delta\Psi$ mit physiologischer Polarität (innen negativ) und einen ebenfalls physiologisch nach innen orientierten ΔpH als Triebkraft für die LysP-vermittelte Lysinaufnahme. Basierend auf diesen Resultaten stellt sich die essentielle Frage, ob LysP einen Lysin-Uniport- oder einen Lysin/ H^+ -Symportmechanismus katalysiert. Fungiert LysP als Membranpotential-getriebener Uniporter, so wird pro Transportzyklus eine Ladung (Lys^+) transportiert. Der korrespondierende (elektro-)chemische Lysingradient sollte in diesem Falle $\Delta\Psi$ nicht übertreffen (R. Kaback, persönliche Mitteilung). Wird Lysin allerdings im Symport mit einem Proton pro Zyklus über die Zytoplasma- bzw. Proteoliposomenmembran transferiert, so werden zwei Ladungen pro Lysin transportiert und der (elektro-)chemische Lysingradient sollte theoretisch 10-fach höher sein als $\Delta\Psi$ (R. Kaback, persönliche Mitteilung).

Im Hinblick auf alle folgenden experimentellen und theoretischen Kalkulationen für das Verständnis der Energetik/Stöchiometrie der LysP-katalysierten Lysinaufnahme war die Bestimmung des internen Volumens der LysP-Proteoliposomen unabdingbar. Gemäß dem Versuchssatz von Garcia *et al.* konnte nach einstündiger Äquilibration mit L-[^{14}C]Lysin (0,374 mM, 288 $\mu\text{Ci} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) und anschließender Verdünnung durch den Verdünnungsbasierten Verlust an L-[^{14}C]Lysin (Daten nicht gezeigt) und dessen spezifischen Aktivität die Stoffmenge an ausgeströmten L-[^{14}C]Lysin bestimmt werden [= 0,0017 nmol L-[^{14}C]Lysin, (Garcia *et al.*, 1983)]. Durch in Relationssetzen dieser Stoffmenge mit der externen Konzentration an L-[^{14}C]Lysin im Reaktionsansatz (= 0,0408 mM) konnte dann das interne Volumen der Proteoliposomen berechnet werden: 1 μL Proteoliposomen, die 0,288 μg Protein (LysP) enthalten, haben ein internes Volumen von 0,0406 μL .

Durch Einbeziehung des experimentell bestimmten internen Volumens der LysP-Proteoliposomen und der maximalen Stoffmenge an L-[^{14}C]Lysin, die in Gegenwart der variierenden Membranpotentiale durch LysP in die Proteoliposomen transportiert wurde (siehe Abb. 28), kann so die korrespondierende maximale Lysinakkumulation und daraus mit Hilfe der Nernst-Gleichung der (elektro-)chemische Lysingradient (externe Lysinkonzentration = 10 μM) kalkuliert werden (Tab. 11, Spalten 6 und 7).

Tab. 11: Experimentelle Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ (Spalten 2 und 3) und rechnerische Kalkulation des Effektes von variierendem $\Delta\Psi$ auf die maximale Lysinakkumulation (Spalte 6) und den korrespondierenden (elektro-)chemischen Lysingradienten $\Delta\mu_{\text{Lys}^+}$ (Spalte 7). Detaillierte Skizzierung der entsprechenden Rechenwege siehe Text. Die Anzahl der co-transportierten Kationen (n, Spalte 8) wurde basierend auf der Größe der PMF über der Proteoliposomenmembran (Spalte 5) und dem (elektro-)chemischen Lysingradienten (Spalte 7) mit Hilfe der Mitchell-Gleichung bestimmt (Driessen *et al.*, 1987). PMF, Protonenmotorische Kraft ($\text{PMF} = \Delta\Psi - Z \cdot \Delta\text{pH}$, wobei $Z = (2,3 \cdot R \cdot T) \cdot F^{-1} = \sim 59 \text{ mV}$; R, universelle Gaskonstante; T, absolute Temperatur; F, Faraday-Konstante).

1	2	3	4	5	6	7	8
$\Delta\Psi$ berechnet [mV] (siehe Abb. 28)	max. [^3H]TPP $^{+}$ - Akkumulation [mM]	$\Delta\Psi$ bestimmt [mV]	$Z \cdot \Delta\text{pH}$ [mV]	PMF [mV]	max. Lysin- akkumulation [mM] (siehe Abb. 28)	(elektro-) chemischer Lysingradient ($\Delta\mu_{\text{Lys}^+}$) [mV]	n
-153	0,10	-177	-	-177	9,9	-177	0
-130	0,08	-171	-	-171	8,2	-172	0
-103	0,03	-148	-	-148	6,6	-166	0,1
-70	0,02	-130	-	-130	3,0	-146	0,1
-35	0,01	-118	-	-118	0,5	-100	0

Da es sich im Falle der durch Valinomycin generierten Kaliumdiffusionsgradienten ($\Delta\Psi$, innen negativ, $\text{pH}_{\text{innen}} 7,6$, $\text{pH}_{\text{außen}} 7,6$) über der Proteoliposomenmembran um Nernst-Potentiale handelt, können folglich die entsprechenden (elektro-)chemischen Lysingradienten mit $\Delta\Psi$ verglichen werden.

Für diese Gegenüberstellung und der theoretischen Kalkulation der Anzahl an potentiellen co-transportierten Kationen wurden alle artifiziell generierten Membranpotentiale (siehe Abb. 28) über der LysP-Proteoliposomenmembran mittels der $\Delta\Psi$ -abhängigen Akkumulation des lipophilen $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ -Kations experimentell quantifiziert. Es wurde eine Korrelation zwischen der maximalen $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ -Akkumulation und der Größenzunahme [$\Delta\Psi (1) < \Delta\Psi (2) < \Delta\Psi (3) < \Delta\Psi (4) < \Delta\Psi (5)$] der durch Valinomycin erzeugten Membranpotentiale beobachtet (Abb. 32).

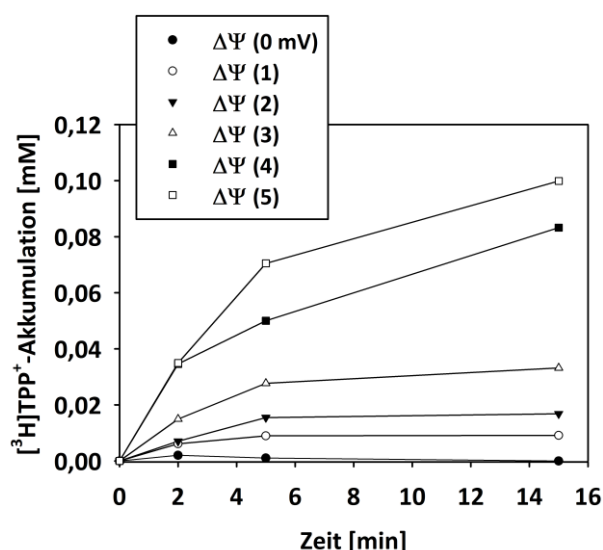


Abb. 32: Effekt von variierenden Kaliumdiffusionsgradienten auf die $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ -Akkumulation in LysP-Proteoliposomen.

Verschiedene $\Delta\Psi$ (1) bis (5) wurden durch theoretisch kalkulierte Volumina der 100 mM Tris/Mes- und 100 mM KPi -Pufferkomponenten (je pH 7,6), aus denen sich der jeweilige Transportreaktionsansatz zusammensetzte, generiert (siehe Abb. 28). Die Proteoliposomen (in 100 mM KPi , pH 7,6, 1 mg Protein $\cdot\text{mL}^{-1}$) wurden 400-fach in dem entsprechenden Puffermix (1) bis (5), versetzt mit 2 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM MgCl_2 , 0,2 μM Valinomycin und 0,1 μM $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$, verdünnt. Die Reaktionen wurden unter der Verwendung einer Schnell-Filtrations-Methode abgestoppt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Zeitabhängige Messungen der Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ zeigten, dass nach 15 min Reaktionszeit die komplette Äquilibration des lipophilen Kations erreicht wurde (Abb. 32). In Abwesenheit von $\Delta\Psi$ (0 mV) erfolgte keine Akkumulation von TPP^+ (Abb. 32, schwarze Kreise). Basierend auf der Verteilung von $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ (externe $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ -Konzentration = 0,1 μM , max. $[^3\text{H}]\text{TPP}^+$ -Akkumulation siehe Tab. 11, Spalte 2) konnten so mit Hilfe der Nernst-Gleichung die Größen der entsprechenden Membranpotentiale berechnet werden (Tab. 11, Spalte 3). Interessanterweise übertrafen die so experimentell ermittelten Größen für $\Delta\Psi$ (Tab.

11, Spalte 3) deutlich die theoretisch kalkulierten Potentiale (Tab. 11, Spalte 1). Anhand dieser höheren Werte der generierten Potentiale konnten die Diskrepanzen, die im Zuge der Gegenüberstellung der kalkulierten theoretischen maximalen Lysinakkumulation (basierend auf den $\Delta\Psi$ -Größen Tab. 11, Spalte 1) mit der experimentell bestimmten maximalen Lysinakkumulation (Tab. 11, Spalte 6) offensichtlich wurden, erklärt werden (Tab. 12, Spalten 2B und 3B). Während in diesem Falle die experimentell bestimmte maximale Lysinakkumulation die theoretisch mögliche Akkumulation um den Faktor 3-19 übertraf (Tab. 12, Spalte 4B), zeigte der Vergleich der auf der $\Delta\Psi$ -Quantifizierung (Tab. 11, Spalte 3) basierten Kalkulation der theoretischen maximalen Lysinakkumulation mit der experimentell ermittelten Lysinakkumulation (Tab. 12, Spalten 2A und 3A) nur sehr geringe Unterschiede in der Größenordnung um Faktor 2 (Tab. 12, Spalte 4A). Im Hinblick auf diese Übereinstimmung zwischen Experiment und theoretischer Berechnung wurden im Folgenden für alle stöchiometrischen Kalkulationen die Werte der experimentellen Quantifizierung von $\Delta\Psi$ herangezogen (Tab. 11, Spalte 3).

Tab. 12: Gegenüberstellung der berechneten theoretischen maximalen Lysinakkumulation und der experimentell bestimmten maximalen Lysinakkumulation in den LysP-Proteoliposomen (siehe Abb. 28). Detaillierte Darstellung der zugrundeliegenden Rechenwege siehe Text. Die theoretische maximale Lysinakkumulation (Spalte 2) wurde A. basierend auf $\Delta\Psi$ -bestimmt (siehe Tab. 11, Spalte 3) und B. $\Delta\Psi$ -berechnet (siehe Tab. 11, Spalte 1) kalkuliert.

	1	2	3	4
	$\Delta\Psi$ [mV]	berechnete theoretische max. Lysinakkumulation [mM]	bestimmte max. Lysinakkumulation [mM] (siehe Abb. 28)	Abweichung (Faktor)
A	$\Delta\Psi$ bestimmt			
	-177	10,0	9,9	1
	-171	7,9	8,2	1
	-148	3,2	6,6	2
	-130	1,4	3,0	2
	-118	1,0	0,5	2
B	$\Delta\Psi$ berechnet			
	-153	3,9	9,9	3
	-130	1,4	8,2	6
	-103	0,5	6,6	13
	-70	0,2	3,0	19
	-35	0,04	0,5	13

Der Vergleich der bestimmten Potentiale (Tab. 11, Spalte 3) mit den korrespondierenden (elektro-)chemischen Lysingradienten (Tab. 11, Spalte 7) macht deutlich, dass alle $\Delta\mu_{\text{Lys}^+}$ die generierten Membranpotentiale nicht/kaum übersteigen. Diese Resultate implizieren einen $\Delta\Psi$ -abhängigen LysP-vermittelten Lysin-Uniportmechanismus, wobei pro Transportzyklus maximal ein einfach positiv geladenes Lysin (Lys^+) transloziert wird.

Kation-Aminosäure-Stöchiometrien können mit Hilfe der Mitchell-Gleichung durch Berechnung von $\Delta\mu_{\text{Substrat}}$ und der Protonen-motorischen Kraft ($\text{PMF} = \Delta\Psi - Z \cdot \Delta\text{pH}$) kalkuliert werden [(Driessen *et al.*, 1987), Tab. 11, Spalten 5, 7 und 8]:

$$n = \Delta\mu_{\text{Substrat}} \cdot \text{PMF}^{-1};$$

n, Anzahl der co-transportierten Kationen;

Die maximale Akkumulation von Lysin bei pH 7,6 (Lys^+) bei einer PMF von -177, -171, -148, -130 und -118 mV prognostiziert eine Kation: Lys^+ -Stöchiometrie von 0-0,1:1 (Tab. 11, Spalte 8). Dieses rechnerische Ergebnis spricht ebenfalls für einen LysP-vermittelten Uniportmechanismus (Translokation von 1x Lys^+ pro Zyklus).

Die Beobachtung, dass die Lysinaufnahme neben $\Delta\Psi$ durch ΔpH getrieben wird (siehe Abb. 27A), impliziert für LysP eine mögliche Funktion als Lysin/ H^+ -Symporter. Daher wurde für die Kalkulation der $\text{H}^+:\text{Lys}^+$ -Stöchiometrie in Analogie zu der detaillierten Analyse des Einflusses von $\Delta\Psi$ auf die maximale Lysinakkumulation (Tab. 11) der Effekt von variierenden pH-Gradienten auf den (elektro-)chemischen Lysingradienten rechnerisch ermittelt (Tab. 13).

Tab. 13: Rechnerische Kalkulation des Effektes von ΔpH (A. nach innen und B. nach außen orientiert) auf die maximale Lysinakkumulation (Spalte 6) und den korrespondierenden (elektro-)chemischen Lysingradienten $\Delta\mu_{\text{Lys}^+}$ (Spalte 7). Detaillierte Skizzierung der entsprechenden Rechenwege siehe Text. Berechnung der co-transportierten Kationen (n, Spalte 8) siehe Legende von Tab. 11.

	1	2	3	4	6	7	8
	LysP-Proteoliposomen	$\Delta\Psi$ [mV]	$Z \cdot \Delta\text{pH}$ [mV]	PMF [mV]	max. Lysin- akkumulation (mM) (siehe Abb. 27A und Abb. 30)	(elektro-) chemischer Lysingradient ($\Delta\mu_{\text{Lys}^+}$) [mV]	n
A	pH _{innen} 7,6 pH _{außen} 5,8	-	100	-100	0,4	-93	0
B	pH _{innen} 5,8 pH _{außen} 7,6	-	-100	100	-	-	-

Allerdings wurde basierend auf diesen theoretischen Berechnungen im Falle des nach innen gerichteten pH-Gradienten ($\text{pH}_{\text{innen}} = 7,6$, $\text{pH}_{\text{außen}} = 5,8$, kein $\Delta\Psi$) unerwarteterweise eine $\text{H}^+:\text{Lys}^+$ -Stöchiometrie von 0:1 ermittelt (Tab. 13, Spalte 8A). Da bereits im Hinblick auf die artifiziell generierten Membranpotentiale durch experimentelle Quantifizierung im Vergleich zu den entsprechenden theoretischen Kalkulationen signifikant höhere Werte für $\Delta\Psi$ bestimmt wurden (siehe Tab. 11, Spalten 1 und 3), könnte auch die theoretische Berechnung von ΔpH mit Fehlern behaftet sein. Daher ist für detaillierte stöchiometrische Kalkulationen die experimentelle Quantifizierung der pH-Gradienten unabdingbar (siehe 7. Ausblick).

6 Diskussion

6.1 Biochemische Charakterisierung von LysP

Die APC-Superfamilie repräsentiert die zweitgrößte Superfamilie von sekundären Transportern (Wong *et al.*, 2012). Mitglieder dieser Superfamilie sind präsent in Bakterien, Archaeen, Hefen, Pilzen, unizellulären eukaryotischen Protisten, Schleimpilzen, Pflanzen und Tieren (Saier Jr, 2000). Mitglieder der Superfamilie fungieren als Solut/Kation-Symporter und Solut/Solut-Antiporter (Saier Jr, 2000, Schweikhard & Ziegler, 2012, Wong *et al.*, 2012). Basierend auf neuesten phylogenetischen bioinformatischen Studien inkludiert die APC-Superfamilie 11 Familien, u. a. die APC-Familie [(Wong *et al.*, 2012), TC (engl. transporter classification database)-Nummer: 2.A.3]. Die APC-Familie wiederum umfasst 15 Subfamilien - darunter befindet sich die AAT-Familie (TC-Nummer: 2.A.3.1), zu der die Lysinpermease LysP von *E. coli* zählt [TC-Nummer: 2.A.3.1.2, (Saier *et al.*, 2009)]. 36 Transportproteine bilden die auf Bakterien-beschränkte AAT-Familie, die durch eine Größe von 433-586 Aminosäuren (LysP: 489 AS), durch einen transmembranen Aufbau aus 12 α -Helices und durch eine breite Substratspezifität (d. h. keine Restriktion auf Aminosäuren mit gleichen chemisch-physikalischen Eigenschaften) charakterisiert ist (Jack *et al.*, 2000). Die Aufnahme von Aminosäuren in die Bakterienzelle entgegen eines Konzentrationsgradienten durch AAT-Mitglieder ist assoziiert mit der Dissipation des elektrochemischen Protonengradienten $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ über der Zytoplasmamembran und erfolgt im Symport mit Protonen (Jung *et al.*, 2006). Im Hinblick auf die phylogenetische Zugehörigkeit von *E. coli* LysP zur AAT-Familie wurde daher bislang der Lysinpermease eine Funktion als Lysin/H⁺-Symporter zugesprochen (Keseler *et al.*, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Vermutung überprüft und die erste umfassende detaillierte biochemische Charakterisierung von LysP durchgeführt. Die Studien mit intakten Zellen identifizierten LysP als hochaffines ($K_{\text{M(Lys)}}$ -Wert = 2,5 μM , $V_{\text{max}} = 39,5 \text{ nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg Protein})^{-1}$) und L-Lysin-spezifisches Transportprotein. Die initialen in vivo Experimente ermittelten eine energetische Kopplung des LysP-vermittelten Lysintransportes an das elektrochemische Protonenpotential über der Zytoplasmamembran ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). Um nun zu differenzieren, ob der Lysintransport an den chemischen Protonengradienten (ΔpH) und/oder an die elektrische Komponente ($\Delta\Psi$) von $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ gekoppelt ist, wurde die Transportaktivität von LysP mit Hilfe eines in vitro Proteoliposomensystems in Gegenwart genau definierter artifiziell generierter Ionengradienten getestet. Als primäre Triebkraft für den Lysintransport

wurde $\Delta\Psi$ mit physiologischer Polarität (innen negativ) identifiziert. Zunehmend negative Membranpotentiale resultierten in Erhöhung der maximalen Lysinakkumulation (lineare Abhängigkeit zwischen der Lysinakkumulation und $\Delta\Psi$). Diese Kopplung an $\Delta\Psi$ repräsentiert den einfachsten Aufnahmemechanismus einer kationischen Aminosäure gemäß eines unidirektionalen Uniportmechanismus, der z. B. im Falle des Lysintransportes bei *Bacillus stearothermophilus* (Heyne *et al.*, 1991) und *Staphylococcus aureus* (Niven & Hamilton, 1974) verwirklicht ist. Allerdings stellte sich im Gegensatz zu *B. stearothermophilus* und *S. aureus* außerdem ein nach innen orientierter pH-Gradient ($\text{pH}_{\text{innen}} 7,6$, $\text{pH}_{\text{außen}} 5,8$, kein $\Delta\Psi$) im Vergleich zu $\Delta\Psi$ als weniger effiziente Triebkraft für den LysP-vermittelten Lysintransport heraus - diese Beobachtung spricht LysP eine Funktion als Lysin/ H^+ -Symporter zu. Ein invertierter pH-Gradient ($\text{pH}_{\text{innen}} 5,8$, $\text{pH}_{\text{außen}} 7,6$, kein $\Delta\Psi$) führte zu keiner Lysinaufnahme. Solch ein Proton(en)/Symport-Mechanismus als Grundlage der Lysinaufnahme wurde für *Lactococcus lactis* beschrieben, wobei sowohl ΔpH , als auch speziell $\Delta\Psi$ als Triebkräfte für die Transportreaktion identifiziert wurden (Driessen *et al.*, 1989). Studien mit *L. lactis* zeigten, dass im Vergleich zu $\Delta\Psi$ oder ΔpH als einzige Gradienten die zeitgleiche Anwesenheit von $\Delta\Psi$ und ΔpH (entspricht $\Delta\mu_{\text{H}^+}$) in signifikant höherer Lysinakkumulation in den Membranvesikeln resultierte (Driessen *et al.*, 1989). Diese $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -abhängige ($\Delta\Psi$ und ΔpH , $\text{pH}_{\text{innen}} 7,6$, $\text{pH}_{\text{außen}} 5,8$) Erhöhung des Lysintransportes wurde im Falle von LysP nicht beobachtet, da, wie auch das pH-Profil offenbarte, niedrige pH-Werte ($\text{pH}_{\text{außen}} < 7,5$) selbst in Gegenwart von $\Delta\Psi$ per se inhibierend auf die LysP-Aktivität wirkten. In Anbetracht der co-sensorischen Rolle von LysP im Cad-System, das die Lysin-abhängige Adaptation von *E. coli* an Säurestress vermittelt, kann derzeit über die physiologische Funktion des pH-Optimums der LysP-Aktivität im leicht alkalischen Bereich ($\text{pH}_{\text{außen}} \sim 7,5-8,0$) nur spekuliert werden. So kann z. B. die pH-abhängige Protonierung/Öffnung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten periplasmatischen Salzbrücke (Asp-Arg, siehe 5.3.4) zwischen dem Co-Sensor LysP und dem pH-Sensor CadC durch damit einhergehende Konformationsänderungen des Transportproteins die LysP-Transportaktivität indirekt beeinflussen. Die Entdeckung dieser pH-abhängigen protonierbaren Positionen (Asp) in LysP sprechen dem Trigger-Transporter neben den beiden Funktionen als Lysin-Transporter und -Co-Sensor eine weitere Funktion als „pH-Sensor“ im Cad-System zu. Inwiefern die beobachtete Reduktion der LysP-Transportaktivität durch niedrige externe pH-Werte mit dieser zusätzlichen Rolle als „pH-Sensor“ korreliert, ist noch unklar. Trotz der regulatorischen und sensorischen Rolle von LysP im Cad-System und der nachgewiesenen Lysin- und pH-abhängigen direkten Interaktion zwischen CadC und LysP

hatte nach Co-Rekonstitution in *E. coli* Phospholipide CadC keinen Einfluss auf die LysP-Transportaktivität.

Neben dem Membranpotential (innen negativ) fungiert ein pH-Gradient mit physiologischer Orientierung als Triebkraft für die LysP-vermittelte Lysinaufnahme. Mittels detaillierter stöchiometrischer/energetischer Kalkulationen wurde in Gegenwart aller getesteten variierenden $\Delta\Psi$ ($\text{pH}_{\text{außen}} 7,6$) unter Berücksichtigung der korrespondierenden (elektro-) chemischen Lysingradienten $\text{H}^+:\text{Lys}^+$ -Stöchiometrien von 0-0,1:1 ermittelt. Diese rechnerischen Resultate implizieren einen $\Delta\Psi$ -getriebenen elektrogenen Lysin-Uniportmechanismus in Gegenwart von $\text{pH}_{\text{außen}} 7,6$. Diese Hypothese ist konsistent mit den thermodynamischen Betrachtungen nach Rottenberg, nach denen beruhend auf der chemiosmotischen Hypothese gemäß Mitchell ($\text{PMF} = \Delta\Psi - Z \cdot \Delta\text{pH}$) die Kopplung des aktiven Transports positiv geladener Substrate (z. B. basischer Aminosäuren) nicht zwingend an den Symport mit Protonen gekoppelt sein muss, da $\Delta\Psi$ in diesem Fall für den Substrattransport entgegen eines Konzentrationsgradienten ausreichend ist (Rottenberg, 1976). Gemäß Rottenberg folgt die Triebkraft für den Uniport von positiv geladenen Substraten folgender Gleichung (Rottenberg, 1976):

$$Z \cdot (\log A_{\text{innen}}^{+z} \cdot (\log A_{\text{außen}}^{+z})^{-1}) = z \cdot \Delta\Psi;$$

$$\text{wobei } Z = (2,3 \cdot R \cdot T) \cdot F^{-1} = \sim 59 \text{ mV};$$

A, Substrat;

(+)z, Ladung des positiv geladenen Substrates A;

Damit steht die Beobachtung im Einklang, nach der die bestimmten (elektro-)chemischen Lysingradienten die korrespondierenden Membranpotentiale nicht übertrafen (siehe Tab. 11). Des Weiteren implizieren die theoretischen Ausführungen von Rottenberg eine in Gegenwart von niedrigen externen pH-Werten eine zusätzliche Abhängigkeit dieser Uniporter von ΔpH (Rottenberg, 1976):

$$Z \cdot (\log A_{\text{innen}}^{+z} \cdot (\log A_{\text{außen}}^{+z})^{-1}) = -(n+z) \cdot \Delta\Psi + n \cdot Z \cdot \Delta\text{pH};$$

$$\text{wobei } Z = (2,3 \cdot R \cdot T) \cdot F^{-1} = \sim 59 \text{ mV};$$

A, Substrat;

(+)z, Ladung des positiv geladenen Substrates A;

n, Anzahl der co-transportierten Protonen;

Interessanterweise wurde bei der *in vitro* Charakterisierung von LysP diese von Rottenberg postulierte zusätzliche, wenn auch im Vergleich zur Abhängigkeit von $\Delta\Psi$ geringer ausgeprägte Korrelation zwischen der Lysinaufnahme und ΔpH ($\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ 5,8) beobachtet [siehe Tab. 13, (Rottenberg, 1976)]. Leider war in Ermangelung einer experimentellen Quantifizierung von pH_{innen} und $\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ die Kalkulation der korrespondierenden $\text{H}^+:\text{Lys}^+$ -Stöchiometrie möglicherweise fehlerhaft, da eine $\text{H}^+:\text{Lys}^+$ -Stöchiometrie von 0:1 berechnet wurde (siehe Tab. 13).

Basierend auf den Ausführungen von Rottenberg (Rottenberg, 1976) und den Ergebnissen der vorliegenden biochemischen Charakterisierung scheint die LysP-Transportaktivität in Gegenwart von alkalischen externen pH-Werten hauptsächlich von $\Delta\Psi$ abhängig zu sein, während in Gegenwart von niedrigen pH-Werten ΔpH bzw. beide Komponenten (ΔpH und $\Delta\Psi$) von $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ als Triebkraft für die LysP-vermittelte Lysinaufnahme fungieren können. Da elektrochemische Na^+ - und Li^+ -Gradienten ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ und $\Delta\mu_{\text{Li}^+}$) in Gegenwart von $\Delta\Psi$ keinen steigernden Einfluss auf den LysP-vermittelten Lysintransport in Proteoliposomen hatten, spricht die Integration aller rechnerischen und experimentellen Resultate der *in vivo* und *in vitro* Analysen inklusive aller energetischer Betrachtungen übereinstimmend dafür, dass LysP in Abhängigkeit des externen pH-Wertes den Lysinimport auf zwei unterschiedliche Weisen katalysieren kann: Lysin-Uniport (pH 7,6) und Lysin/ H^+ -Symport (pH 5,8).

Frühe experimentelle Befunde von Ramos und Kaback zeigten, dass unabhängig von $\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ der (elektro-)chemische Lysingradient den generierten elektrischen Gradienten $\Delta\Psi$ über der Membran von *E. coli* Membranvesikeln deutlich überstieg (Ramos & Kaback, 1977). Stöchiometrische Kalkulationen basierend auf den Resultaten von Ramos und Kaback implizieren unabhängig von $\text{pH}_{\text{au\ss en}}$ eine $\text{H}^+:\text{Lys}^+$ -Stöchiometrie von 1:1 (Ramos & Kaback, 1977) und sprechen für einen LysP-vermittelten Lysin/ H^+ -Symport. Allerdings konnte im Falle des Versuchssets (*E. coli* Membranvesikel) gemäß Ramos und Kaback nicht spezifiziert werden, ob der beobachtete Lysinimport ausschließlich auf die Aktivität von LysP zurückzuführen war und ob folglich die bestimmten Größen des (elektro-)chemischen Lysingradienten durch die Aktivität weiterer Lysinaufnahmesysteme verfälscht wurden.

Im Gegensatz zu der im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vitro* erzielten Hemmung der LysP-Transportaktivität durch niedrige pH-Werte beobachteten Steffes und Mitarbeiter nach Kultivierung der Bakterien in Gegenwart von niedrigem pH-Wert, Anaerobiose und der Anwesenheit von Lysin eine deutliche Steigerung der Lysinaufnahme in *E. coli* Zellen (Steffes *et al.*, 1992). Diesen Effekt führten Steffes *et al.* auf die durch diese Faktoren hochregulierte Aktivität/Genexpression von LysP/*lysP* zurück (Steffes *et al.*, 1992).

Allerdings muss in diesem Falle angemerkt werden, dass die Experimente von Steffes *et al.* mit Wildtyp *E. coli* Zellen im Hintergrund aller Lysintransportsysteme durchgeführt wurden (Steffes *et al.*, 1992). Die bestimmten Transportraten repräsentieren folglich überlappende Transportaktivitäten von LysP, CadB und des LAO-Systems von *E. coli*. Die Summe aus niedrigem pH, hohen Konzentrationen an Lysin und niedrigem Sauerstoffpartialdruck bildet die Induktorkombination für die Aktivierung der Expression des *cadBA* Operons von *E. coli* (Sabo *et al.*, 1974). Somit ist die gesteigerte Lysinakkumulation eher der erhöhten zellulären Proteinmenge an CadB und der damit verbundenen Zunahme des durch CadB katalysierten L-Lysin/Cadaverin-Antiports (Meng & Bennett, 1992a, Meng & Bennett, 1992b) zuzuordnen als der erhöhten Aktivität von LysP bzw. der gesteigerten Expression von *lysP*. Diese Aussage ist außerdem konsistent mit den Ergebnissen von Ruiz *et al.*, die eindeutig belegen, dass die Expression von *lysP* einer negativen Feedback-Hemmung durch das Substrat Lysin unterliegt, während der niedrige extrazelluläre pH-Wert keinen Expressions-regulierenden Effekt auf *lysP* hatte (Ruiz *et al.*, 2011).

6.2 Das regulatorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP

6.2.1 Die konstitutive physikalische CadC/LysP-Interaktion

Die Hauptfunktion von Membran-integrierten Transportproteinen ist die Translokation von spezifischen Substraten über die bakterielle Zytoplasmamembran. Derzeit mehren sich die Belege, dass Transportproteine neben dem eigentlichen Soluttransport zusätzliche regulatorische Funktionen akquiriert haben und daher als Trigger-Transporter fungieren (Tetsch & Jung, 2009b). Trigger-Transporter sind in der Lage, Signale innerhalb/über der/die Zytoplasmamembran zu Komponenten der korrespondierenden Transduktionskaskade zu transferieren und dabei spezifische adäquate zelluläre Antworten zu generieren. Für alle beschriebenen bifunktionalen Transporter werden direkte Protein-Protein-Interaktionen (PPI) mit Membran-integrierten oder löslichen Komponenten der gekoppelten Signaltransduktions-Kaskaden postuliert (Tetsch & Jung, 2009a). Allerdings fehlen im Falle der meisten Sensor/Co-Sensor-Paare aussagekräftige experimentelle Beweise für diese prognostizierte PPI. Darüber hinaus mangelt es an Kenntnissen über Proteinpositionen, die die PPI innerhalb der putativen heterooligomeren Grenzfläche vermitteln. In Signal-Kaskaden involvierte PPI sind zumeist durch transienten oder metastabilen Charakter gekennzeichnet, da deren (regulatorische) Funktion auf rascher Assoziation bzw. Dissoziation der Monomere basiert

(Nooren & Thornton, 2003). Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die detaillierte molekulare Analyse der PPI zwischen der Lysinpermease LysP und dem Membran-integrierten pH-Sensor CadC von *E. coli*. Interessanter- und unerwarteterweise implizieren die Daten der durchgeführten in vivo BACTH-Interaktionsanalysen eine stabile und permanente Interaktion zwischen dem Sensor und dem Transporter des CadC/LysP-Systems. Allerdings unterliegt diese PPI durch Lysin- und niedrigen pH-Wert-getriggerten subtilen Modulierungen. Die starke CadC/LysP-Interaktion unter nicht-Cad-induzierenden Bedingungen (pH 7,6, kein Lysin) erfährt eine deutliche Abschwächung in Gegenwart von Cad-aktivierenden Konditionen (pH 5,8, Lysinkonzentrationen $> 2 \mu\text{M}$). Der im Zuge der BACTH-Studien ermittelte Lysinkonzentrations-Schwellenwert steht im Einklang mit dem apparenten $K_{\text{M(Lys)}}$ -Wert für LysP Wildtyp ($\sim 2,5 \mu\text{M}$) und deutet darauf, dass konformationelle Änderungen von LysP nach Bindung und/oder Translokation von Lysin in einer verminderten Interaktion zwischen Sensor und Co-Sensor resultieren. Jedoch kommt es erst ab Lysinkonzentrationen höher als $0,5 \text{ mM}$ zu einer vollen Aktivierung des Cad-Systems, da eine effiziente Säurestress-Adaptation großer Mengen an Lysin für den Decarboxylierungsschritt bedarf (Fritz *et al.*, 2009). Folglich besteht zwischen $K_{\text{M(Lys)}}$ von LysP sowie der Schwellenwert-Lysinkonzentration für die Attenuation der CadC/LysP-PPI und dem für die Induktion von *cadBA* benötigten Lysinlevel eine deutliche Diskrepanz. Tetsch und Mitarbeiter zeigten, dass CadC nicht als direkter Lysinsensor arbeitet und der Lysinstimulus ausschließlich durch LysP wahrgenommen wird (Tetsch *et al.*, 2008). Weiterhin kann die Beteiligung von zusätzlichen Komponenten an dem Lysin-Detektions- und Transduktionsprozess ausgeschlossen werden, da die Lysin-unabhängige Expression von *cadBA* exklusiv in einem LysP-defizienten *E. coli* Stamm beobachtet wurde (Neely *et al.*, 1994). Die Befunde, dass die Überproduktion von LysP die *cadBA* Expression durch Inhibition von CadC unter Cad-aktivierenden Bedingungen drastisch reduziert (Neely *et al.*, 1994) und dass gewisse CadC-Varianten diesen hemmenden Effekt aufheben können (Tetsch *et al.*, 2008), machen die Partizipierung von weiteren Faktoren in der Lysin-abhängigen Signaltransduktion logisch nicht notwendig und daher höchst unwahrscheinlich. Diese konträren Feststellungen können durch die Postulation in Einklang gebracht werden, nach der ein LysP-Monomer zwei unterschiedlich affine Bindestellen für Lysin aufweist. Grundlage dieser Hypothese ist die Annahme, dass die Bindung des Substrates an eine hochaffine Bindestelle weitreichende Konformationsänderungen in LysP hervorruft, die die im Zuge der BACTH-Analyse beobachtete Attenuation der CadC/LysP-PPI bedingen. Für die regulatorische Funktion von LysP bzw. für die Weiterleitung des Lysinsignals zu CadC scheint allerdings darüber hinaus

die Besetzung einer zweiten niedrigaffinen Lysin-Bindestelle erforderlich zu sein. Es wird vermutet, dass diese Bindung eines zweiten Lysinmoleküls in deutlich geringeren strukturellen Veränderungen von LysP resultiert, die anhand des BACTH-Systems nicht detektiert werden können. Obwohl für einige Mitglieder der LeuT-Strukturfamilie zwei Substratbindestellen postuliert werden, wird derzeit die Präsenz bzw. die Rolle einer zweiten Bindestelle innerhalb eines Transportermonomers sehr kontrovers diskutiert (Yamashita *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2008).

Neben der Lysin-abhängigen Kontrolle unterliegt die CadC/LysP-Interaktion dem Einfluss von Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes, dem zweiten Stimulus des Cad-Systems. Es wird vermutet, dass pH-abhängige konformationelle Änderungen (Haneburger *et al.*, 2011) und die Reduktion der periplasmatischen Disulfidbrücke in CadC (Tetsch *et al.*, 2011) die Interaktion zwischen beiden Proteinen vermindern. Außerdem ist die pH-abhängige Abschwächung der PPI konsistent mit den beobachteten Effekten der zielgerichteten Mutation von D275 und D278 in der vierten periplasmatischen Schleife von LysP. Beide Aspartate sind vermutlich an der Bildung von Salzbrücken mit den entsprechenden Partnern R265 und R268 innerhalb der periplasmatischen Domäne von CadC beteiligt. In Gegenwart von niedrigen pH-Werten scheinen die hohen Protonenkonzentrationen für die Auflösung dieser periplasmatischen Brücken verantwortlich zu sein, die eine zusätzliche Attenuation der PPI zur Folge hat.

In Konsistenz wurde darüber hinaus eine Erhöhung der LysP-Oligomerisierung durch niedrige externe pH-Werte verzeichnet. Leider konnte basierend auf der binären Natur des BACTH-Systems die exakte Anzahl an LysP-Monomeren in der homooligomeren Struktur nicht abgeleitet werden. So bildet z. B. der detailliert strukturell und biochemisch charakterisierte Arginin/Agmatin-Antiporter AdiC von *E. coli*, ebenfalls ein Mitglied der APC-Transporter-Superfamilie, eine tetramere Struktur, die sich aus zwei asymmetrischen Homodimeren zusammensetzt (Gao *et al.*, 2009). Momentan sind sehr wenig Informationen über die physiologische Funktion von oligomeren Zuständen von Transportproteinen verfügbar (Veenhoff *et al.*, 2002, Jung *et al.*, 2006). Neben der Regulation können der pH-abhängigen Homooligomerisierung von LysP weitere Funktionen zugesprochen werden, wie z. B. die korrekte Faltung und Stabilisierung des Proteins innerhalb der Zytoplasmamembran unter Stressbedingungen ähnlich wie im Falle des Natrium/Proton-Antiporters NhaA von *E. coli* (Herz *et al.*, 2009).

6.2.2 Konformationelle Kopplung zwischen der Regulations- und Transportfunktion von LysP

Um die Fragen zu beantworten, wie LysP das Lysinsignal zu CadC transduziert und ob beide Funktionen des bifunktionellen Transporters voneinander abhängig sind, wurden zahlreiche LysP-Varianten mit einfachen und mehrfachen Aminosäureaustauschen hinsichtlich der Co-Sensorik- und der Transportfunktion analysiert. Basierend auf dieser detaillierten Mutagenesestudie kann festgehalten werden, dass beide Funktionen des Trigger-Transporters konformationell gekoppelt sind, da die Seitenketten von Y102, W106, F216, K163, E222, E230, E438, D443 und D446 als essentiell für Regulation und Transport identifiziert wurden. Computergestützte Modellierungsstudien zeigten, dass ein Homologiemodell von LysP auf der Basis des APC-Aminosäuretransporters ApcT von *M. jannaschii* als Template generiert werden kann [siehe 5.1.2, (Shaffer *et al.*, 2009)]. Im Hinblick auf die Proteinfaltung sowie auf die strukturelle Pseudosymmetrie von TM-Helix 1-5 (Wiederholung 1) und TM-Helix 6-10 (Wiederholung 2) weist ApcT typische Charakteristika eines Transportproteins mit konservierter APCS (engl. APC-superfamily)-Faltung auf [Abb. 33, (Yamashita *et al.*, 2005, Wong *et al.*, 2012)].

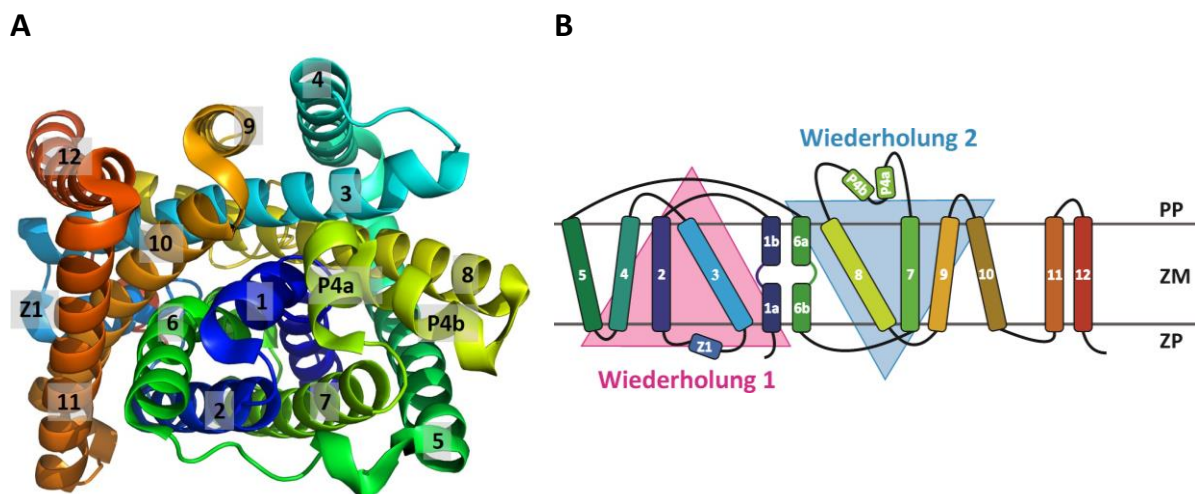


Abb. 33: Architektur des Na⁺-unabhängigen Aminosäuretransporters ApcT von *M. jannaschii* (PDB: 3GIA). A. Kristallstruktur von ApcT aus extrazellulärer Sicht. Das Farbschema der nummerierten 12 TM-Helices folgt dem Regenbogenfarbverlauf (TM-Helix 1: blau, TM-Helix 12: orange-rot). B. 2D-Modell der pseudosymmetrischen APCS-Faltung von ApcT (Koloration siehe A.). Das rosa Dreieck repräsentiert die strukturelle Wiederholung 1 (TM-Helices 1-5) und das blaue Dreieck umfasst die Wiederholung 2 (TM-Helices 6-10). Z1, zytoplasmatische Schleife 1 mit α -helikalem Segment; P4a/b, periplasmatische Schleife bestehend aus zwei α -Helices, separiert durch einen ungewundenen Bereich; 1a/b und 6a/b, diskontinuierliche TM-Helices 1 und 6; PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

Diese generelle pseudosymmetrische APCS-Proteinfaltung wurde durch die seit Kurzem zunehmende Anzahl an aufgeklärten 3D-Strukturen von Transportproteinen aus den Domänen der Archaeen und Bakterien aufgedeckt (siehe Review von Schweikhard und Ziegler, 2012), obwohl die strukturell analysierten Transporter kaum Identitäten in der Aminosäuresequenz, verschiedene Transportmodi bzw. Kopplungsionen und Spezifität für Substrate mit unterschiedlichstem Charakter aufweisen (Chang *et al.*, 2004, Rudnick, 2011). Folglich erlaubt diese penta-helikale Basisproteinfaltung eine enorme mechanistische Flexibilität innerhalb des gleichen strukturellen Rahmens (Forrest & Rudnick, 2009). Das Strukturalignment von verschiedenen APC-Transportproteinen mit gelöster APCS-Faltung {(i) nach außen geöffnete Konformation von AdiC [PDB: 3OB6, (Fang *et al.*, 2009)], (ii) okkludierter Zustand von ApcT [PDB: 3GIA, (Shaffer *et al.*, 2009)] und (iii) nach innen geöffnete Struktur von GadC [PDB: 4DJI, (Ma *et al.*, 2012)]} lässt in Analogie zum Natrium/Leucin-Symporter LeuT [erste aufgeklärte Struktur mit APCS-Faltung, (Yamashita *et al.*, 2005, Krishnamurthy & Gouaux, 2012)] signifikante Konformationsänderungen des Bundle-Motives (TM-Helices 1-2 und 6-7) erkennen (Schweikhard & Ziegler, 2012). Dabei führen die Substrattranslokationspfad-säumenden Bundle-Helices relativ zur angrenzenden und ebenfalls den Transportkanal einrahmenden Gerüst-Hash-Domäne (TM-Helices 3-4 und 8-9) eine rechtsgängige starre Rotation („Rocking“) aus, die das Öffnen und Schließen der nach außen bzw. nach innen gerichteten Hohlräume des Translokationskanals bewirkt [Modell des alternierenden-Zugangsmechanismus, (Abramson & Wright, 2009, Ma *et al.*, 2012)]. Interessanterweise sind die identifizierten Aminosäurepositionen, die bei beiden Funktionen des Trigger-Transporters eine essentielle Rolle spielen, im LysP-3D-Homologiemodell in TM-Helix 3 (Gerüst-Hash-Motiv: Y102, W106), der diskontinuierlichen TM-Helix 6 (Bundle-Motiv: F216, E222) sowie der darauffolgenden zytoplasmatischen Schleife 3 (E230) lokalisiert (Abb. 34). Im Falle von ApcT sind die Aminosäuren L93 und Y97 in TM-Helix 3 entscheidend für die Substratspezifität des Transporters (Shaffer *et al.*, 2009). Die entsprechenden Reste in LysP - Y102 und W106 - scheinen daher ebenfalls im Hinblick auf die erhöhten $K_{M(Lys)}$ -Werte der korrespondierenden LysP-Mutanten Part der Lysinbindestelle zu sein. Darüber hinaus entsprechen die Reste F216 und E222 von LysP den Aminosäuren W202 und E208 des Arginin/Agmatin-Antiporters AdiC von *E. coli* (Zomot & Bahar, 2011). In AdiC sind W202 und E208 ebenfalls im ungewundenen Bereich der diskontinuierlichen TM-Helix 6 (Bundle-Motiv) lokalisiert und sind am Prozess der Substrattranslokation beteiligt (Zomot & Bahar, 2011). In Analogie spricht der erhöhte $K_{M(Lys)}$ -Wert von LysP-E222A dem Glutamatrest eine Funktion in der Bindung der α - oder ε -

Aminogruppe des Substrates Lysin zu. Diese Hypothese wird durch neueste Resultate von Kaur *et al.* gestützt, nach denen der Position Glu222 des LysP-Orthologs STM2200 von *S. typhimurium* eine Rolle als Substratbinderest zukommt [siehe 5.3.3, (Kaur *et al.*, 2013)]. Hingegen impliziert der verringerte V_{\max} -Wert der Variante LysP-F216L eine Beteiligung des aromatischen Restes im Transportzyklus von LysP, vermutlich über die Kontrolle der extrazellulären Pforte ähnlich wie AdiC-W202 (Zomot & Bahar, 2011). Die Beobachtung, dass der LysP-E222 und AdiC-E208 entsprechende Glutamatrest E208 (TM-Helix 6) des Glutamat/GABA-Antiporters GadC von *E. coli* durch die räumliche Nähe zum Transportpfad als sog. Pfortenrest fungiert (Ma *et al.*, 2012), betont die generelle Funktion dieses konservierten Glutamatrestes in Substratbindung und/oder -translokation.

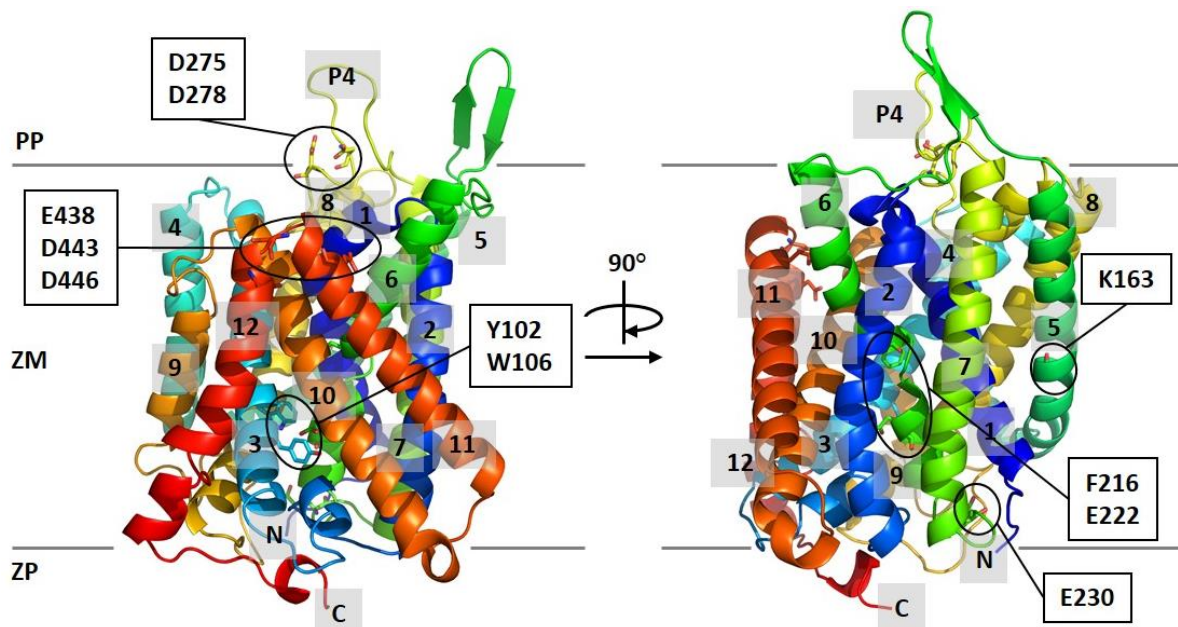


Abb. 34: Lokalisation der Aminosäurepositionen im 3D-Homologiemodell von LysP, die mittels zielgerichteter Mutagenese identifiziert wurden und deren Seitenketten in die Lysin-Co-Sensorik und die Transportfunktion von LysP involviert sind. Die potentiellen periplasmatischen Interaktionsstellen D275 und D278 befinden sich innerhalb der periplasmatischen Schleife 4 (P4). Die farbliche Darstellung der TM-Helices 1 (blau) bis 12 (rot) folgt dem Regenbogenfarbverlauf. N; N-Terminus; C, C-Terminus; PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

Vergleichende strukturelle Analysen (z. B. mit LeuT) und die biochemische Charakterisierung der Variante ApcT-K158A des Aminosäure/Proton-Symporters ApcT implizieren, dass die ϵ -Aminogruppe von K158 (TM-Helix 5) die besetzte zweite Natrium (Na^2)-Bindestelle in Natrium-unabhängigen sekundären Transportern mit APCS-

Proteinfaltung imitiert [Abb. 35, (Shaffer *et al.*, 2009, Schulze *et al.*, 2010, Shi & Weinstein, 2010)].

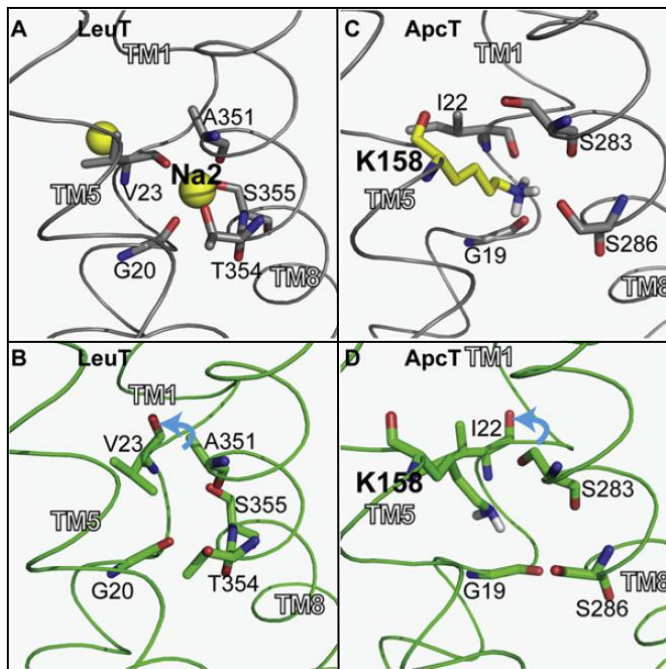


Abb. 35: Konformationsänderungen der von TM-Helices 1, 5 und 8 gesäumten zweiten Na^+ (Na_2)-Bindestelle von LeuT in (A) An- und (B) Abwesenheit des Kopplungsions und des korrespondierenden Proteinbereichs um Lys158 in ApcT mit (C) protonierter und (D) deprotonierter ϵ -Aminogruppe (Quelle: Shi und Weinstein, 2010). Die Bindung von Na_2 in LeuT und die Protonierung von ApcT-K158 modulieren die Disposition der diskontinuierlichen TM-Helix 1a beim Übergang zum nach innen gewandten Konformationszustand [„Rocking Bundle“, blauer Pfeil symbolisiert die entsprechende Knickbewegung, (Shi & Weinstein, 2010)].

Diese Beobachtungen bekräftigen die Wichtigkeit der positiven Ladung exakt an dieser Position in Natrium-unabhängigen Transportproteinen und schlagen für Transportproteine mit APCS-Faltung unabhängig vom katalysierten Transportmodus einen generellen molekularen Mechanismus für die Transition zum nach innen weisenden Konformationszustand vor (molekulare Flexibilität). Die Übereinstimmung von LysP-K163 (TM-Helix 5) mit ApcT-K158 sowie die signifikante Verringerung von V_{\max} der Variante LysP-K163A postuliert in Analogie zu ApcT-K158 die Beteiligung von LysP-K163 an der Isomerisierung zum nach innen gerichteten Konformationszustand im Verlauf des Transportprozesses in Abhängigkeit der De-/Protonierung der ϵ -Aminogruppe. Diese Relevanz von LysP-K163 steht im Einklang mit der Hypothese, dass LysP ähnlich wie ApcT in Gegenwart von niedrigem externen pH-Wert als Natrium-unabhängiger Protonen-gekoppelter Aminosäure-Symporter fungiert.

Alle bislang beschriebenen Aminosäuresubstitutionen in LysP resultierten in Defekten beider Funktionen des bifunktionellen Transporters. Computergestützte Sequenz- und Strukturvergleiche von LysP mit anderen APC-Transportproteinen (ApcT, AdiC, GadC) und die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Studien sprechen den Resten Y102, W106, F216, K163 und E222 eine Bedeutung bei der Ligandenbindung und/oder beim Öffnen/Schließen der extra-/intrazellulären Transportpforte zu, während die genaue funktionale Rolle von LysP-E230 im Zuge der Substratbindung/-translokation und der Lysin-

Co-Sensorik derzeit noch unbekannt ist. Demzufolge basiert die co-sensorische Fähigkeit von LysP auf der strukturellen und konformationellen Integrität des Transportproteins.

Die Aminosäuren LysP-E348, -D443 und -D446, die ebenfalls als essentiell für beide Funktionen des Trigger-Transporters entdeckt wurden, sind am periplasmatischen Ende der TM-Helix 11 (E438) und in TM-Helix 12 (D446) und der diese Helices verbindenden periplasmatischen Schleife 6 (D443) lokalisiert (siehe Abb. 34). Beide TM-Helices 11 und 12 sind vermutlich nicht direkt in den Transportzyklus von ApcT involviert (Shaffer *et al.*, 2009). Allerdings ist die Homodimerisierung von AdiC begründet in der Interaktion von TM-Helix 11 des einen Monomers und der TM-Helix 12 des benachbarten Monomers. Diese durch die TM-Helices 11 und 12 vermittelte Dimerisierung ist vermutlich ein einzigartiges Charakteristikum der APC-Superfamilie (Gao *et al.*, 2009). Diese Beobachtung regte die Vermutung an, dass die negativ geladenen Aminosäuren E438, D443 und D446 von LysP in noch nicht bekannter Weise an der pH-abhängigen Oligomerisierung von LysP partizipieren.

6.2.3 Die periplasmatischen Interaktionsstellen zwischen Sensor und Co-Sensor

BACTH-Analysen mit zahlreichen CadC-Varianten, charakterisiert durch Einzel- und Mehrfachsubstitutionen, variierenden Domänenaufbau oder unterschiedlichen Verkürzungsgrad zeigten, dass neben der TM-Helix die periplasmatische Domäne des pH-Sensors an der Vermittlung oder Modulation der physikalischen PPI zwischen CadC und LysP partizipiert. In Konsistenz zur *in vivo* Interaktionsstudie wurden durch gerichtete Mutagenese R265 und R268 in der periplasmatischen Domäne von CadC identifiziert, die vermutlich spezifisch das Heterooligomer über die Bildung von Salzbrücken mit D275 und D278 in LysP stabilisieren. Laut LysP-3D-Homologiemodell sind diese beiden Aspartate in der periplasmatischen Schleife 4 (P4) lokalisiert, die die TM-Helices 7 und 8 verbinden (siehe Abb. 34). P4 scheint bei anderen Transportproteinen mit APCS-Faltung nach der Bindung des entsprechenden Liganden eine Schlüsselrolle in der Zugangsregulierung der Substratbindestelle von der periplasmatischen Seite her zu übernehmen (Krishnamurthy & Gouaux, 2012). Ein allgemeingültiges Kennzeichen dieser Schleife ist der Aufbau aus zwei α -helikalen Domänen, die durch einen kurzen unstrukturierten Bereich verknüpft sind. Erstaunlicherweise sind bei phylogenetisch eng verwandten Transportproteinen der AAT-Familie keine korrespondierenden Äquivalente zu LysP-D275 und -D278 zu finden (siehe Abb. 15). Beide Aspartatreste sind eindeutig nicht in die konformationelle Kopplung von Transport- und Regulationsfunktion von LysP involviert, da die simultane Substitution der

negativ geladenen Seitenketten keinen Einfluss auf die Lysintransportaktivität ausübte. Stattdessen resultierte der Austausch dieser Reste in einer LysP-Variante (LysP-D275A_D278A), die aufgrund von fehlender Interaktion mit CadC dessen Aktivität in Abwesenheit von Lysin nicht mehr (ausreichend) hemmen konnte. Diese Beobachtung wird gestützt durch den Befund, dass beim BACTH-Test keine PPI zwischen der Variante LysP-D275A_D278A und CadC Wildtyp dokumentiert werden konnte. Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die periplasmatische Schleife 4 von LysP zusätzlich zur Funktion beim alternierenden-Zugangsmechanismus im Zuge des Lysintransportes eine weitere Aufgabe bei der Bildung von heterooligomeren CadC/LysP-Komplexen annektiert hat.

R265 und R268 von CadC sind Oberflächen-exponierte Aminosäuren, die in der N-terminalen Subdomäne 1 der periplasmatischen pH-Sensierungsdomäne lokalisiert sind (siehe Abb. 19). Der Austausch beider Arginine hatte eine CadC-Variante zur Folge (CadC-R265A_R268A), die eine pH-abhängige Aktivierung der Zielgene bedingte, aber nicht mehr dem inhibitorischen Einfluss von LysP unterstand. Dieses Resultat spricht für die Hypothese, dass sich LysP-D275, -D278 und CadC-R265, -R268 in ausreichender Nähe zueinander befinden, um innerhalb der CadC/LysP-Heterooligomergrenzfläche Wasserstoffbrücken oder Ionenpaare ausbilden zu können. Ein Ionenpaar ist als Salzbrücke definiert, wenn das Seitenketten-Carbonylsauerstoffatom von Asp/Glu und der Seitenketten-Stickstoff von Arg/Lys/His durch weniger als 4,0 Å voneinander separiert sind (Kumar & Nussinov, 1999).

Angeichts der pH-induzierten Rolle des Cad-Systems bei der Säurestressanpassung von *E. coli* ist eine Bildung einer LysP-Asp/CadC-Arg Salzbrücke bei pH 7,6 denkbar (Asp in deprotonierter Form, Arg in protonierter Form), während die Protonierung von Asp bei niedrigem pH (5,8) die ionische Wechselwirkung zwischen Sensor und Transporter aufhebt (Onufriev *et al.*, 2001, Lu *et al.*, 2006). Der Proteinregion um R265 in CadC wurde bereits im Rahmen früherer Studien eine bedeutende Stellung bei der Wahrnehmung des Lysinsignals zugeordnet (Neely *et al.*, 1994, Dell *et al.*, 1994, Tetsch *et al.*, 2008, Tetsch *et al.*, 2011). Allerdings waren in allen Fällen die Aminosäuresubstitution-bedingten Störungen der Lysin-Co-Sensorik auf die dramatische artifizielle Veränderung der Seitenketten [z. B. CadC-N263K und -Q266P (Dell *et al.*, 1994)] und der damit verbundenen indirekten Beeinträchtigung der Konformation der benachbarten R265 und R268 zurückzuführen. In Anbetracht der (i) Identifikation von D275/D278 in LysP und R265/R268 in CadC als potentielle Interaktionsstellen, (ii) der Attenuation der CadC/LysP-PPI bei pH 5,8 oder Lysinkonzentrationen > 2 µM und (iii) der pH-abhängigen Formierung der periplasmatischen Disulfidbrücke in CadC [Öffnung dieser Brücke partizipiert vermutlich an der Abschwächung

der CadC/LysP-PPI (Tetsch *et al.*, 2008)] ist es sehr wahrscheinlich, dass der Co-Sensorik-Mechanismus nicht nur auf der Lysin-abhängigen konformationellen Kopplung, sondern darüber hinaus auf pH-abhängigen Modifikationen der Kontaktfläche zwischen CadC und LysP beruht.

Mit Hilfe einer STRING- [engl. search tool for the retrieval of interacting genes/proteins (Franceschini *et al.*, 2013)] Datenbankanalyse wurde ermittelt, dass CadC neben dem *E. coli*-Taxon in anderen Enterobakterien (z. B. *Klebsiella pneumoniae* 342, *Salmonella enterica* Ty2, *Serratia proteamaculans*), aber auch in verschiedenen *Vibrio*-Spezies vorkommt. Interessanterweise sind im Falle aller Enterobakterien, die auch über den Co-Sensor LysP verfügen, die korrespondierenden Argininreste zu *E. coli* CadC-R265/R268 bzw. die äquivalenten Phenylalaninreste zu *E. coli* CadC-F165 höchst konserviert (Anhang Abb. A2), während bei den *Vibrio*-Spezies (z. B. *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus* YJ016, *Vibrio cholerae* 0395), deren Genom kein Ortholog zu *lysP* aufweist, interessanterweise keine Äquivalente zu R265/R268 bzw. Phe165 zu finden sind (Anhang Abb. A2). Allerdings befindet sich an der zu *E. coli* CadC-R268 analogen Aminosäureposition bei *V. cholerae* und *V. vulnificus* ein Lysinrest mit gleicher physikalisch-chemischer Eigenschaft wie Arg. Leider konnte in der Literatur trotz der detaillierteren experimentellen Analyse des Cad-Systems bei *Vibrio cholerae* (Merrell & Camilli, 2000) und *Vibrio vulnificus* (Rhee *et al.*, 2005) keine Information zur Lysinabhängigkeit der *cadBA* Expression bei *Vibrio*-Spezies gefunden werden. Trotz dieser Wissenslücke scheinen beide Arg-Reste und der Phe-Rest eine spezifisch akquirierte Eigenschaft der periplasmatischen Subdomäne 1 von CadC bei gleichzeitig vorhandenem LysP zu sein. Diese Vermutung und die Tatsache, dass bei zahlreichen LysP-Orthologen (z. B. *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus*) auch ohne simultanes genomisches *cadC*-Vorkommen zumindest ein negativ geladener Aminosäurerest (Glu oder Asp) entsprechend den Positionen von *E. coli* LysP-D275/D278 konserviert ist, implizieren die höchst spekulative Hypothese, nach der sich evolutionär CadC durch die Akquisition von R265/R268 und F165 als potentielle Interaktionsstellen auf molekularer Ebene an den Co-Sensor LysP „angenähert“ hat.

6.2.4 Modell für das regulatorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP

Die Integration der Ergebnisse früherer Studien und aller Resultate der BACTH-Interaktionsanalyse bzw. der detaillierten Mutagenesestudie von CadC und LysP postuliert das Modell der konformationellen Hemmung, nach dem LysP über transmembrane und

periplasmatische Kontakte durch direkte PPI in Abwesenheit von Lysin die CadC-Aktivität inhibiert (Abb. 36).

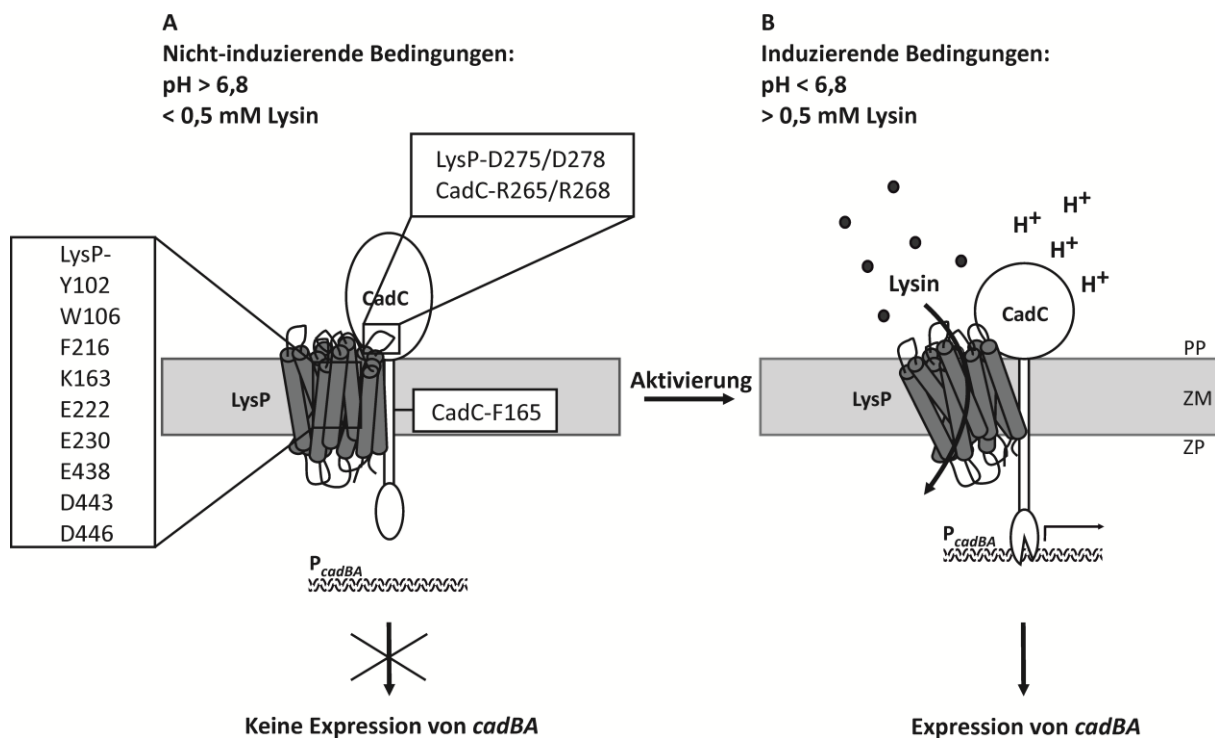


Abb. 36: Modell für das co-sensorische Wechselspiel zwischen CadC und LysP. A. Unter nicht-induzierenden Bedingungen hemmt LysP die Aktivität von CadC durch transmembrane und periplasmatische Interaktionen. B. Durch Bindung/Translokation von Lysin induzierte Konformationsänderungen von LysP schwächen die Interaktion mit CadC, ohne die PPI komplett aufzulösen. CadC ist nun zugänglich für die Aktivierung durch niedrigen pH-Wert. Überdies destabilisieren pH-abhängige Modulationen der periplasmatischen ionischen Wechselwirkungen die CadC/LysP-PPI. LysP und CadC, die vermutlich in der Zytoplasmamembran als Heterodimere oder -oligomere vorliegen, sind im Modell als Monomere dargestellt. PP, Periplasma; ZM, Zytoplasmamembran; ZP, Zytoplasma.

Dabei kommt bei der Bildung der CadC/LysP-Heterooligomeren Phe165 in der TM-Helix von CadC eine besondere Rolle als Kontaktstelle zwischen beiden Proteinen zu. Trotz intensiver Mutationsanalyse sind die Positionen in LysP, die die Interaktion mit CadC-F165 vermitteln, noch unbekannt. In Anwesenheit von Lysin bedingt die Anlagerung des Substrates an die Bindestelle(n) und/oder die Substrattranslokation konformationelle Änderungen von LysP, die das Lysinsignal durch subtile Modulationen der CadC/LysP-PPI, ohne Dissoziation beider Proteine, zu CadC transferieren. Nun ist CadC zugänglich für die Aktivierung durch niedrigen pH-Wert, und es kommt zur Induktion der Zielgene *cadBA*, falls dieser zweite Stimulus des Cad-Systems präsent ist. Die infolge von Ansäuerung des umgebenden Milieus

getriggerte Öffnung der periplasmatischen Disulfidbrücke (Cys208-Cys272) in CadC und der Salzbrücke zwischen LysP-D275/D278 und CadC-R265/R268 schwächt zudem die Interaktion zwischen Sensor und Co-Sensor und garantiert somit eine maximale Aktivierung von CadC unter Cad-induzierenden Bedingungen (pH < 6,8, Lysinkonzentrationen > 0,5 mM).

6.2.5 Vergleich des CadC/LysP-Paares mit dem DcuS/DctA-DcuB-System aus *E. coli* und dem BceS/BceB-Modul von *B. subtilis*

Ein weiteres sehr gut untersuchtes Beispiel für einen sekundären Trigger-Transporter ist neben LysP der C₄-Dicarboxylat/H⁺-Symporter DctA von *E. coli*, der neben der Transportfunktion die Regulation der Membran-integrierten Sensor-Histidinkinase DcuS unter Aerobiose akquiriert hat (Witan *et al.*, 2012a). Das Zwei-Komponentensystem DcuSR aktiviert in Gegenwart von extrazellulären C₄-Dicarboxylaten die Expression der Gene für die anaerobe Fumaratatmung (*dcuB*, *fumB*, *frdABCD*) und unter aeroben Bedingungen die Transkription von *dctA* (Golby *et al.*, 1999). Die Bildung von DcuS/DctA-Sensoreinheiten basiert im Gegensatz zu den transmembranen und periplasmatischen ionischen Interaktionen des CadC/LysP-Paares auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der zytoplasmatischen PAS_C-Domäne von DcuS und einem LDXXXLXXXL-Motiv innerhalb der putativen zytosolischen Helix 8b am C-Terminus von DctA (Witan *et al.*, 2012a). Da die spezifische Detektion und Bindung von C₄-Dicarboxylaten über die periplasmatische sensorische PAS_P-Domäne von DcuS erfolgt (Kneuper *et al.*, 2005), spielt die PAS_C-Domäne durch die Integration der eingehenden Signale von PAS_P und DctA und deren Transfer zur Kinasedomäne von DcuS eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion (Witan *et al.*, 2012b). Unter anaeroben Bedingungen fungiert der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB als Co-Sensor von DcuS (Kleefeld *et al.*, 2009, Bauer, 2010). Während die Transport- und Regulationsfunktion von LysP funktionell miteinander gekoppelt sind, werden bei DcuB beide Aufgaben durch unterschiedliche Proteinbereiche unabhängig voneinander ausgeführt (Kleefeld *et al.*, 2009). Im Kontrast zum DcuS/DctA-DcuB-System steht beim Cad-Modul die Expression von *lysP* nicht unter der Kontrolle des regulierten Sensorpartners CadC (Ruiz *et al.*, 2011) und das Lysinsignal wird ausschließlich durch den Co-Sensor LysP wahrgenommen (Tetsch *et al.*, 2008). Interessanterweise wird im Falle beider Sensor/Co-Sensor-Paare eine konstitutive PPI postuliert, die nach Stimulusdetektion und -transfer nicht vollständig aufgelöst wird (Bauer, 2010, Witan *et al.*, 2012a).

Neben sekundären Transportern sind in der Literatur auch primäre Transportsysteme als Co-Sensoren von Membran-integrierten Sensoren beschrieben (siehe Review Tetsch & Jung, 2009a). Ein sehr gut untersuchtes Beispiel ist der ABC-Transporter BceAB von *B. subtilis*, der im Rahmen des Bacitracin-Resistenz-Moduls (BceRS-BceAB-Modul) eine duale Funktion als Bacitracin-Detoxifizierungspumpe und als (Co)-Sensor für das Polypeptid-Antibiotikum ausübt (Rietkötter *et al.*, 2008). Ähnlich dem CadC/LysP-Paar aus *E. coli* übernimmt dabei ausschließlich BceB die Stimulusperzeption und transferiert das Signal in noch unbekannter Weise zu der Histidinkinase BceS (Kallenberg *et al.*, 2013). Diese Wechselwirkung zwischen BceB und BceS beruht ebenfalls auf direkter PPI (Kallenberg *et al.*, 2013). Neueste Mutagenesestudien implizieren eine funktionale Kopplung beider Funktionen des Trigger-Transporters BceB (Kallenberg *et al.*, 2013). Allerdings scheinen im Unterschied zu LysP beide Eigenschaften von BceB nicht strikt miteinander gekoppelt zu sein, da diese durch die Einführung von Einfach-Aminosäuresubstitutionen (partiell) genetisch separiert werden konnten (Kallenberg *et al.*, 2013). Die so identifizierten Aminosäurepositionen, die für Transport- und Sensoraktivität von BceB wichtig sind, befinden sich im C-terminalen Bereich, besonders in TM-Helix 8 (Kallenberg *et al.*, 2013). Analog zum DcuS/DctA-DcuB-System induziert BceS nach BceAB-abhängiger Aktivierung und Signalperzeption in Gegenwart von Bacitracin die Expression von *bceAB* (Staroń *et al.*, 2011).

Die Kombination von Transportproteinen als co-sensorische Komponenten mit nachgeschalteten Signaltransduktions-Maschinerien ist bei Bakterien ein weit verbreitetes generelles Prinzip (siehe Review Tetsch & Jung, 2009a). Allerdings macht besonders der Vergleich der CadC/LysP- und DcuS/DctA-DcuB-Systeme deutlich, dass der molekulare Mechanismus (z. B. die Interaktionsstellen innerhalb der PPI) der Co-Sensorik nicht nur abhängig ist von den spezifischen molekularen Charakteristika der korrespondierenden Transportproteine und der Signaltransduktions-Kaskade, sondern auch von der Natur der durch das Sensor/Co-Sensor-Paar detektierten Stimuli.

6.2.6 Das Konzept der Transzeptoren bei Eukaryoten

In Analogie zum Konzept der bifunktionellen Trigger-Transporter bei Bakterien sind für die Domäne der Eukaryoten zahlreiche Beispiele von Plasmamembran-integrierten aktiv transportierenden Nährstofftransportern mit zusätzlichen Rezeptor- und Sensorfunktionen bekannt, die direkt an der Detektion von extrazellulären Nährstoffen und der Transduktion eines adäquaten Signals zu Komponenten von korrespondierenden Signaltransduktions-

Kaskaden partizipieren (Thevelein & Voordeckers, 2009). Für eine klare Abgrenzung von klassischen Rezeptoren wurden diese Transporter-Rezeptoren als Transzeptoren betitelt (Holsbeeks *et al.*, 2004). Die duale Funktion von verschiedensten Aminosäure-Transzeptoren wurde z. B. bei niederen Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* [z. B. Gap1, (Donaton *et al.*, 2003)], aber auch bei Säugetieren [HeLa-Zelllinien; z. B. SNAT2, (Hyde *et al.*, 2007)] experimentell demonstriert und postuliert.

Ein auf molekularer Ebene sehr gut untersuchter eukaryotischer aktiv transportierender Transzeptor ist die Aminosäurepermease Gap1 von *S. cerevisiae* (Donaton *et al.*, 2003, Van Zeebroeck *et al.*, 2008). Zeebroeck und Mitarbeiter zeigten, dass Transport- und Sensierungsfunktion von Gap1, ähnlich wie für LysP postuliert, von der Ligandenbindung an die gleiche Substratbindestelle(n) innerhalb des Transportproteins abhängig sind (Van Zeebroeck *et al.*, 2008). Substratbindung und/oder -translokation generiert in Analogie zu dem für LysP vorgeschlagenen molekularen Mechanismus der konformationellen Hemmung ein durch Konformationsänderungen von Gap1 getriggertes Signal, das zu nachgeschalteten Komponenten der korrespondierenden Signaltransduktionskaskade transferiert wird. Es wird postuliert, dass dieser Vorgang der Signalweiterleitung über die Plasmamembran keinen kompletten Transportzyklus benötigt, sondern scheinbar nur von der Initiation des Translokationsprozesses abhängig ist (Van Zeebroeck *et al.*, 2008).

Neben der Identifikation von aktiv transportierenden Transzeptoren wurden sowohl bei Eukaryoten (z. B. Ssy1 von *S. cerevisiae*), als auch bei Prokaryoten (z. B. UhpC von *E. coli*) Membranproteine entdeckt, die hohe Sequenz- und Strukturidentität zu Nährstofftransportern aufweisen, aber keine (bzw. Rest-) Transportaktivität zeigen (Thevelein & Voordeckers, 2009). Auch im Falle von Ssy1 und UhpC scheint ähnlich zu LysP und Gap1 eine Korrelation zwischen Transport und Sensierungsfunktion zu bestehen, wobei die initialen konformationellen Änderungen nach Bindung des Liganden an die Substratbindestelle(n) die entsprechende Signaltransduktions-Konformation der Proteine repräsentieren (Schwöppe *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2006). Auf der Entdeckung von transportierenden und nicht-transportierenden Transzeptoren basiert die Hypothese, nach der sich Rezeptoren für chemische Signale aus evolutionärer Sicht über intermediäre Transzeptorstadien aus reinen Nährstofftransportern entwickelt haben (Thevelein & Voordeckers, 2009).

Interessanterweise zählen alle bislang als transportierende und nicht-transportierende Transzeptoren identifizierten eukaryotischen Membranproteine zur APC-Superfamilie von Transportern (Hundal & Taylor, 2009). Gap1 (TC-Nummer: 2.A.3.10.2) und Ssy1 (TC-Nummer: 2.A.3.10.12) von *S. cerevisiae* sind Mitglieder der YAT (engl. yeast amino acid

transporter)-Familie (Subfamilie der APC-Familie, TC-Nummer: 2.A.3.10). Wie bereits erwähnt gehört der prokaryotische Trigger-Transporter LysP ebenfalls zu den Mitgliedern der APC-Familie, allerdings im Unterschied zu Gap1 und Ssy1 zu einer anderen Subfamilie (AAT-Subfamilie, TC-Nummer: 2.A.3.1). Demnach zeichnen sich derartige Transportproteine (Transzeptoren/Trigger-Transporter) mit dualer Funktion ungeachtet ob eu- oder prokaryotischer Herkunft im Verlauf der Evolution durch einen hohen Konservierungsgrad aus.

7 Ausblick

Obwohl für die Transduktion des Lysinsignals von LysP zu CadC ein konformationell getriggelter Mechanismus postuliert wird, ist noch nicht bekannt, welcher Konformationszustand von LysP im Verlauf des Transportzyklus die tatsächliche Signaltransferkonformation repräsentiert. Vergleichende 3D-Kristallstrukturanalysen von LysP Wildtyp in An- und Abwesenheit von Lysin, sowie von LysP-E222A (permanent inhibitorische Konformation), LysP-E230V (permanent nicht-inhibitorische Konformation) und z. B. LysP-D113N (Transport-defiziente Konformation) wären das Mittel der Wahl für die strukturelle Erfassung von konformationellen Änderungen des Trigger-Transporters nach Ligandenbindung. Trotz der zunehmenden Veröffentlichung von 3D-Strukturen von Transportproteinen handelt es sich bei diesem Versuchansatz zur Strukturaufklärung eines stark hydrophoben Membranproteins um ein sehr schwieriges Unterfangen. Eine praktikable Alternative für die Visualisierung der Lysin- und pH-abhängigen transmembranen Konformationsänderungen/Proteindynamik von LysP und CadC bzw. LysP/CadC-Komplexen ist die Methode der multi-dimensionalen Festkörper NMR (engl. solid-state nuclear magnetic resonance, ssNMR), die die Analyse molekularer 3D-Strukturen von Ligand-Protein- und Protein-Protein-Komplexen in nichtkristallinen Systemen ermöglicht (Baldus, 2006). Im Zuge der ssNMR können Membranproteine nach Reinigung und Rekonstitution bzw. Co-Rekonstitution in künstlichen Lipiddoppelschichten studiert werden. Sowohl für LysP, als auch für CadC existieren etablierte Reinigungs- und (Co-)Rekonstitutionsprotokolle.

Die genaue Lage innerhalb der Tertiärstruktur von LysP und die Rolle als potentielle Substratbindestellen der identifizierten Aminosäurepositionen Y102, W106, F216, K163, E222 und E230, kann mittels Cystein-Zugänglichkeits-Analysen definiert werden. Ein Cystein-freies LysP (LysP- Δ Cys) mit unbeeinträchtigter Regulations- und Transportaktivität ist bereits vorhanden. Nach Einführung von Cys-Resten an den aufgelisteten Positionen in LysP- Δ Cys und anschließender 2-Stufen in vivo-Markierung der Sulfhydrylgruppen mit Membran-permeablen und -impermeablen Reagenzien [1. Stufe: z. B. AMS und NEM, 2. Stufe: PEGmal (Bauer *et al.*, 2011)] kann anhand von Massenverschiebung via SDS-PAGE und Western Blot-Analyse die Lokalisation der Aminosäurepositionen als extra- oder intrazellulär präzisiert werden. Diese Technik erlaubt außerdem durch Insertion weiterer Cys-Reste die Determination der Topologie von LysP und des vermutlichen Substrattranslokationskanals. Ergänzend zur experimentellen Verifizierung der LysP-Topologie kann die auf computergestützten Modellierungs- und Ligandenandocktechniken

basierte Validierung des generierten LysP-Homologiemodells (Template: 3D-Struktur von ApcT, PDB: 3GIA) neue Einsichten in die 3D-Struktur und Lage der Ligandenbindestelle(n) der Lysinpermease liefern (Olkhova *et al.*, 2011).

Nach wie vor ist der Partner in LysP für die Interaktion mit CadC-F165 nicht bekannt. Die Lage von F165 innerhalb der hydrophoben TM-Helix des pH-Sensors impliziert ebenfalls eine transmembrane Lokalisation der korrespondierenden direkten Interaktionsstelle in LysP. Für das Screening der 12 TM-Helices von LysP nach einem Partner für CadC-F165 bieten sich z. B. die *in vivo* TOXCAT- und GALLEX-Two-Hybrid-Techniken an, mit denen die Assoziation von einzelnen Transmembranhelices untersucht werden kann (Russ & Engelman, 1999, Schneider & Engelman, 2003, Lis & Blumenthal, 2006). So kann im besten Fall die Suche auf eine TM-Helix in LysP eingegrenzt werden. Der systematische Austausch aller Aminosäuren dieser Helix und erneute Analyse der Interaktion der generierten LysP-TM-Helix-Varianten mit der TM-Domäne von CadC mittels TOXCAT oder GALLEX könnte zum Aufspüren des spezifischen Partners für Phe165 führen. Die Verwendung dieser Two-Hybrid-Methoden ermöglicht auch im Hinblick auf die Homooligomerisierung von LysP neue Erkenntnisse über die Rolle der TM-Helices 11 und 12 bzw. der entsprechenden Helices mit Mutationen an Position E438, D443 und D446 bei der Bildung von homooligomeren Komplexen.

Als fehlendes Bindeglied zwischen dem $K_{M(Lys)}$ -Wert von LysP ($\sim 2,5 \mu M$), dem Lysinlevel ($> 2 \mu M$) für die Attenuation der CadC/LysP Interaktion und der Lysinkonzentration ($> 0,5 mM$) benötigt für die CadC-vermittelte Induktion von *cadBA* wurde die Präsenz einer zweiten niedriger affinen Bindestelle (S2) für Lysin postuliert. In Analogie zu LeuT kann die Kombination von computergestützten molekularen dynamischen Simulationen (Template: 3D-Struktur bzw. validiertes 3D-Homologiemodell von LysP), zielgerichteter Mutagenese der vermuteten S2 und Transport- und Bindungsstudien mit Wildtyp LysP bzw. den LysP-S2-Mutanten [z. B. SPA, engl. scintillation proximity binding assay (Quick & Javitch, 2007) oder Durchfluss-Dialyse (Veldhuis *et al.*, 2004)] zur Quantifizierung der Lysin:LysP-Ratio neue Erkenntnisse über die Existenz einer zweiten Substratbindestelle in LysP bringen (Shi *et al.*, 2008).

Die *in vitro* Identifikation von ΔpH als Triebkraft für den LysP-vermittelten Lysintransport impliziert einen durch LysP katalysierten Lysin/ H^+ -Symportmechanismus bei niedrigen externen pH-Werten. Für genaue stöchiometrische Kalkulationen hinsichtlich des ΔpH -getriebenen Lysintransports ist die experimentelle Quantifizierung von ΔpH und somit der H^+ -Konzentration im Lumen der LysP-Proteoliposomen nötig. Eine Möglichkeit für die

Quantifizierung der inneren Protonenkonzentration ist die Analyse der auf der pH-abhängigen Ionisierung der 8-Hydroxylgruppe ($pK_s = 7,2$) basierten Fluoreszenzintensität des im Lumen der LysP-Proteoliposomen eingeschlossenen pH-sensitiven Fluorophors Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonat) (Clement & Gould, 1981). Neben der Größe von pH_{innen} kann, sollte LysP als Protonensymporter fungieren, mit Hilfe des pH-Reporters Pyranin der mögliche Lysin-induzierte H^+ -Influx nach der externen Zugabe von Lysin (zum Zeitpunkt Null) und die damit verbundene potentielle innere Azidifizierung quantitativ und zeitabhängig bestimmt werden.

8 Literatur

- Abramson, J. & E. M. Wright, (2009) Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**: 425-432.
- Ali, M. H. & B. Imperiali, (2005) Protein oligomerization: how and why. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 5013-5020.
- Auger, E., K. Redding, T. Plumb, L. Childs, S. Y. Meng & G. Bennett, (1989) Construction of *lac* fusions to the inducible arginine- and lysine decarboxylase genes of *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **3**: 609-620.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner & H. Mori, (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**: 2006:0008.
- Baldus, M., (2006) Molecular interactions investigated by multi-dimensional solid-state NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 618-623.
- Bauer, J., (2010) The C₄-dicarboxylate carriers DcuB and DctA of *Escherichia coli*: function as cosensors and topology. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz*.
- Bauer, J., M. J. Fritsch, T. Palmer & G. Unden, (2011) Topology and accessibility of the transmembrane helices and the sensory site in the bifunctional transporter DcuB of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **50**: 5925-5938.
- Bearson, S., B. Bearson & J. W. Foster, (1997) Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**: 173-180.
- Bekker, M., S. Alexeeva, W. Laan, G. Sawers, J. T. de Mattos & K. Hellingwerf, (2010) The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J. Bacteriol.* **192**: 746-754.
- Bernsel, A., H. Viklund, J. Falk, E. Lindahl, G. von Heijne & A. Elofsson, (2008) Prediction of membrane-protein topology from first principles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 7177-7181.
- Bernsel, A., H. Viklund, A. Hennerdal & A. Elofsson, (2009) TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res.* **37**: W465-W468.
- Binter, A., N. Staunig, I. Jelesarov, K. Lohner, B. A. Palfey, S. Deller, K. Gruber & P. Macheroux, (2009) A single intersubunit salt bridge affects oligomerization and catalytic activity in a bacterial quinone reductase. *FEBS J.* **276**: 5263-5274.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode & G. F. Mayhew, (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.

- Boeker, E. A. & E. E. Snell, (1972) Amino acid decarboxylases, p. 217-253. In P. D. Boyer (ed.), The enzymes, 3rd ed., Vol. 6, *Academic Press, New York*.
- Bower, J. M. & M. A. Mulvey, (2006) Polyamine-mediated resistance of uropathogenic *Escherichia coli* to nitrosative stress. *J. Bacteriol.* **188**: 928-933.
- Bröer, S. & R. Krämer, (1990) Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 7241-7248.
- Buurman, E. T., D. McLaggan, J. Naprstek & W. Epstein, (2004) Multiple paths for nonphysiological transport of K⁺ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 4238-4245.
- Caldara, M., G. Dupont, F. Leroy, A. Goldbeter, L. De Vuyst & R. Cunin, (2008) Arginine biosynthesis in *Escherichia coli*. Experimental perturbation and mathematical modeling. *J. Biol. Chem.* **283**: 6347-6358.
- Casalino, M., M. Carmela Latella, G. Prosseda, P. Ceccarini, F. Grimont & B. Colonna, (2005) Molecular evolution of the lysine decarboxylase-defective phenotype in *Shigella sonnei*. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 503-512.
- Casalino, M., M. C. Latella, G. Prosseda & B. Colonna, (2003) CadC is the preferential target of a convergent evolution driving enteroinvasive *Escherichia coli* toward a lysine decarboxylase-defective phenotype. *Infect. Immun.* **71**: 5472-5479.
- Castanie-Cornet, M.-P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott & J. W. Foster, (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3525-3535.
- Celis, T., H. Rosenfeld & W. Maas, (1973) Mutant of *Escherichia coli* K-12 defective in the transport of basic amino acids. *J. Bacteriol.* **116**: 619-626.
- Chang, A. B., R. Lin, W. K. Studley, C. V. Tran & J. Saier, Milton H, (2004) Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* **21**: 171-181.
- Chu, B. C., T. DeWolf & H. J. Vogel, (2013) The role of the two structural domains from the periplasmic *E. coli* histidine binding protein HisJ. *J. Biol. Chem.* **288**: 31409-31422.
- Clement, N. R. & J. M. Gould, (1981) Pyranine (8-hydroxy-1, 3, 6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **20**: 1534-1538.
- Cronan Jr, J. E., (2002) Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 202-205.
- Crowley, P. B. & A. Golovin, (2005) Cation- π interactions in protein-protein interfaces. *Proteins* **59**: 231-239.
- Dell, C., M. Neely & E. Olson, (1994) Altered pH and lysine signalling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli cadBA* operon. *Mol. Microbiol.* **14**: 7-16.

- Dillon, S. C. & C. J. Dorman, (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 185-195.
- Donaton, M. C., I. Holsbeeks, O. Lagatie, G. Van Zeebroeck, M. Crauwels, J. Winderickx & J. M. Thevelein, (2003) The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **50**: 911-929.
- Dougherty, D. A., (1996) Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**: 163-168.
- Driessen, A., K. J. Hellingwerf & W. N. Konings, (1987) Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J. Biol. Chem.* **262**: 12438-12443.
- Driessen, A., C. van Leeuwen & W. N. Konings, (1989) Transport of basic amino acids by membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **171**: 1453-1458.
- Eichinger, A., I. Haneburger, C. Koller, K. Jung & A. Skerra, (2011) Crystal structure of the sensory domain of *Escherichia coli* CadC, a member of the ToxR-like protein family. *Protein Sci.* **20**: 656-669.
- Eisenbach, M., (1982) Changes in membrane potential of *Escherichia coli* in response to temporal gradients of chemicals. *Biochemistry* **21**: 6818-6825.
- Ellis, J., A. Carlin, C. Steffes, J. Wu, J. Liu & B. P. Rosen, (1995) Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiology* **141**: 1927-1935.
- Epstein, W. & B. S. Kim, (1971) Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **108**: 639-644.
- Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong & C. Miller, (2009) Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature* **460**: 1040-1043.
- Fengler, V. H., E. C. Boritsch, S. Tutz, A. Seper, H. Ebner, S. Roier, S. Schild & J. Reidl, (2012) Disulfide bond formation and ToxR activity in *Vibrio cholerae*. *PLoS One* **7**: e47756, DOI:47710.41371/journal.pone.0047756
- Fischer-Le Saux, M., V. Viallard, B. Brunel, P. Normand & N. E. Boemare, (1999) Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1645-1656.
- Fischer, W., L. Windhager, S. Rohrer, M. Zeiller, A. Karnholz, R. Hoffmann, R. Zimmer & R. Haas, (2010) Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res.* **38**: 6089-6101.

- Forrest, L. R. & G. Rudnick, (2009) The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. *Physiology* **24**: 377-386.
- Foster, J. W., (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 898-907.
- Franceschini, A., D. Szklarczyk, S. Frankild, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, J. Lin, P. Minguez, P. Bork & C. von Mering, (2013) STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* **41**: D808-D815.
- Fritz, G., C. Koller, K. Burdack, L. Tetsch, I. Haneburger, K. Jung & U. Gerland, (2009) Induction kinetics of a conditional pH stress response system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **393**: 272-286.
- Futatsugi, L., H. Saito, T. Kakegawa & H. Kobayashi, (1997) Growth of an *Escherichia coli* mutant deficient in respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 141-145.
- Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang & Y. Shi, (2009) Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science* **324**: 1565-1568.
- Garcia, M. L., P. Viitanen, D. L. Foster & H. R. Kaback, (1983) Mechanism of lactose translocation in proteoliposomes reconstituted with *lac* carrier protein purified from *Escherichia coli*. 1. Effect of pH and imposed membrane potential on efflux, exchange, and counterflow. *Biochemistry* **22**: 2524-2531.
- Giangrossi, M., S. Zattoni, A. Tramonti, D. De Biase & M. Falconi, (2005) Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**: 21498-21505.
- Golby, P., S. Davies, D. J. Kelly, J. R. Guest & S. C. Andrews, (1999) Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 1238-1248.
- Greener, A., M. Callahan & B. Jerpseth, (1997) An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol. Biotechnol.* **7**: 189-195.
- Guzman, L.-M., D. Belin, M. J. Carson & J. Beckwith, (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D., J. Jessee & F. R. Bloom, (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**: 63-113.
- Haneburger, I., A. Eichinger, A. Skerra & K. Jung, (2011) New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **286**: 10681-10689.

- Haneburger, I., G. Fritz, N. Jurkschat, L. Tetsch, A. Eichinger, A. Skerra, U. Gerland & K. Jung, (2012) Deactivation of the *Escherichia coli* pH stress sensor CadC by cadaverine. *J. Mol. Biol.* **424**: 15-27.
- Hayes, E., J. Wilks, P. Sanfilippo, E. Yohannes, D. Tate, B. Jones, M. Radmacher, S. BonDurant & J. Slonczewski, (2006) Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* **6**: 89.
- Heermann, R., T. Zeppenfeld & K. Jung, (2008) Simple generation of site-directed point mutations in the *Escherichia coli* chromosome using Red[®]/ET[®] Recombination. *Microb. Cell Fact.* **7**: 14.
- Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn & J. L. Slonczewski, (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 3978-3981.
- Herz, K., A. Rimón, G. Jeschke & E. Padan, (2009) β -Sheet-dependent dimerization is essential for the stability of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter. *J. Biol. Chem.* **284**: 6337-6347.
- Heyne, R., W. De Vrij, W. Crielaard & W. Konings, (1991) Sodium ion-dependent amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **173**: 791-800.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen & L. R. Pease, (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Holsbeeks, I., O. Lagatie, A. Van Nuland, S. Van de Velde & J. M. Thevelein, (2004) The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 556-564.
- Hundal, H. S. & P. M. Taylor, (2009) Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**: E603-E613.
- Hyde, R., E. L. Cwiklinski, K. MacAulay, P. M. Taylor & H. S. Hundal, (2007) Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *J. Biol. Chem.* **282**: 19788-19798.
- Iyer, R., T. M. Iverson, A. Accardi & C. Miller, (2002) A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* **419**: 715-718.
- Iyer, R., C. Williams & C. Miller, (2003) Arginine-arginine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 6556-6561.
- Jack, D. L., I. T. Paulsen & M. H. Saier, (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* **146**: 1797-1814.
- Jores, J., A. G. Torres, S. Wagner, C. B. Tutt, J. B. Kaper & L. H. Wieler, (2006) Identification and characterization of "pathoadaptive mutations" of the *cadBA* operon in several intestinal *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 547-552.
- Jung, H., (1998) Topology and function of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na⁺/solute cotransporter family. *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**: 60-64.

- Jung, H., M. Buchholz, J. Clausen, M. Nietschke, A. Revermann, R. Schmid & K. Jung, (2002) CaiT of *Escherichia coli*, a new transporter catalyzing l-carnitine/ γ -butyrobetaine exchange. *J. Biol. Chem.* **277**: 39251-39258.
- Jung, H., T. Pirsch & D. Hilger, (2006) Secondary transport of amino acids in prokaryotes. *J. Membr. Biol.* **213**: 119-133.
- Jung, H., S. Tebbe, R. Schmid & K. Jung, (1998) Unidirectional reconstitution and characterization of purified Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**: 11083-11088.
- Jung, K., T. Odenbach & M. Timmen, (2007) The quorum-sensing hybrid histidine kinase LuxN of *Vibrio harveyi* contains a periplasmically located N terminus. *J. Bacteriol.* **189**: 2945-2948.
- Jung, K., B. Tjaden & K. Altendorf, (1997) Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 10847-10852.
- Kallenberg, F., S. Dintner, R. Schmitz & S. Gebhard, (2013) Identification of regions important for resistance and signalling within the antimicrobial peptide transporter BceAB of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **195**: 3287-3297.
- Kanjee, U., I. Gutsche, E. Alexopoulos, B. Zhao, M. El Bakkouri, G. Thibault, K. Liu, S. Ramachandran, J. Snider & E. F. Pai, (2011) Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *EMBO J.* **30**: 931-944.
- Kaplan, R. S. & P. L. Pedersen, (1985) Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B. *Anal. Biochem.* **150**: 97-104.
- Karimova, G., J. Pidoux, A. Ullmann & D. Ladant, (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5752-5756.
- Karp, P. D., I. M. Keseler, T. Altman, R. Caspi, C. A. Fulcher, P. Subhraveti, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse & T. Lee, (2011) BioCyc: Microbial genomes and cellular networks. *Microbe* **6**: 176-182.
- Kashiwagi, K., S. Miyamoto, F. Suzuki, H. Kobayashi & K. Igarashi, (1992) Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4529-4533.
- Kaur, J., E. Olkhova, V. N. Malviya, E. Grell & H. Michel, (2014) A L-lysine transporter of high stereoselectivity of the amino acid-polyamine-organocation (APC) superfamily: production, functional characterization and structure modeling. *J. Biol. Chem.* **289**: 1377-1387.
- Kelley, L. A. & M. J. Sternberg, (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**: 363-371.
- Keseler, I. M., J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, J. Ingraham, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil & P. D. Karp, (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **33**: D334-D337.

- Kim, J.-S., S. H. Choi & J. K. Lee, (2006) Lysine decarboxylase expression by *Vibrio vulnificus* is induced by SoxR in response to superoxide stress. *J. Bacteriol.* **188**: 8586-8592.
- Kleefeld, A., B. Ackermann, J. Bauer, J. Krämer & G. Uden, (2009) The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* **284**: 265-275.
- Kneuper, H., I. G. Janausch, V. Vijayan, M. Zweckstetter, V. Bock, C. Griesinger & G. Uden, (2005) The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**: 20596-20603.
- Kraxenberger, T., (2006) Zum Aktivierungsmechanismus des membranintegrierten Transkriptionsregulators CadC in *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Kraxenberger, T., L. Fried, S. Behr & K. Jung, (2012) First insights into the unexplored two-component system YehU/YehT in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **194**: 4272-4284.
- Krishnamurthy, H. & E. Gouaux, (2012) X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states. *Nature* **481**: 469-474.
- Krulwich, T. A., G. Sachs & E. Padan, (2011) Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 330-343.
- Kuipers, O., (1996) Random mutagenesis by using mixtures of dNTP and dITP in PCR. *Methods Mol. Biol.* **57**: 351.
- Kumar, S. & R. Nussinov, (1999) Salt bridge stability in monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* **293**: 1241-1255.
- Küper, C., (2005) Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons durch den Transmembranregulator CadC aus *Escherichia coli*. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Küper, C. & K. Jung, (2005) CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 26-39.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larkin, M., G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm & R. Lopez, (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lassak, J., (2010) Evolution von Zwei-Komponenten-Systemen in *Shewanella oneidensis* MR-1 - Die Histidinkinase ArcS und der Antwortregulator SO_4444 - Zwei Komponenten - Zwei Modelle. *Dissertation, Phillips-Universität Marburg*.

- Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett & J. W. Foster, (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3094-3100.
- Lis, M. & K. Blumenthal, (2006) A modified, dual reporter TOXCAT system for monitoring homodimerization of transmembrane segments of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**: 321-324.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr & R. Randall, (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Lu, J., R. A. Edwards, J. J. Wong, J. Manchak, P. G. Scott, L. S. Frost & J. M. Glover, (2006) Protonation-mediated structural flexibility in the F conjugation regulatory protein, TraM. *EMBO J.* **25**: 2930-2939.
- Ma, D., P. Lu, C. Yan, C. Fan, P. Yin, J. Wang & Y. Shi, (2012) Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* **483**: 632-636.
- Maniatis, T. & E. Fritsch, (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Mendz, G., D. Meek & S. Hazell, (1998) Characterization of fumarate transport in *Helicobacter pylori*. *J. Membr. Biol.* **165**: 65-76.
- Meng, S.-Y. & G. Bennett, (1992a) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J. Bacteriol.* **174**: 2659-2669.
- Meng, S.-Y. & G. Bennett, (1992b) Regulation of the *Escherichia coli cad* operon: location of a site required for acid induction. *J. Bacteriol.* **174**: 2670-2678.
- Merrell, D. S. & A. Camilli, (2000) Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the "ToxR-like" family of transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **182**: 5342-5350.
- Miller, J. H., (1992) A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Miller, V. L. & J. J. Mekalanos, (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Miller, V. L., R. K. Taylor & J. J. Mekalanos, (1987) Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**: 271-279.
- Moffatt, B. A. & F. W. Studier, (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**: 221-227.
- Moreau, P. L., (2007) The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J. Bacteriol.* **189**: 2249-2261.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich, (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**: 263-273.
- Neely, M. N., C. L. Dell & E. R. Olson, (1994) Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli cad* operon. *J. Bacteriol.* **176**: 3278-3285.
- Neely, M. N. & E. R. Olson, (1996) Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* **178**: 5522-5528.
- Nicholas, K. B., H. Nicholas, Jr & D. Deerfield, II, (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW. NEWS* **4**: 14.
- Niven, D. F. & W. A. Hamilton, (1974) Mechanisms of energy coupling to the transport of amino acids by *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **44**: 517-522.
- Noguchi, K., D. P. Riggins, K. C. Eldahan, R. D. Kitko & J. L. Slonczewski, (2010) Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*. *PLoS One* **5**: e10132, DOI: 10.1186/1071-2267-5-10132.
- Nonet, M. L., C. Marvel & D. Tolan, (1987) The *hisT-purF* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Identification of additional genes of the *hisT* and *purF* operons. *J. Biol. Chem.* **262**: 12209-12217.
- Nooren, I. M. & J. M. Thornton, (2003) Diversity of protein–protein interactions. *EMBO J.* **22**: 3486-3492.
- Nugent, T. & D. T. Jones, (2012) Detecting pore-lining regions in transmembrane protein sequences. *BMC Bioinformatics* **13**: 169.
- Olkhova, E., M. Raba, S. Bracher, D. Hilger & H. Jung, (2011) Homology model of the Na⁺/proline transporter PutP of *Escherichia coli* and its functional implications. *J. Mol. Biol.* **406**: 59-74.
- Onufriev, A., D. A. Case & G. M. Ullmann, (2001) A novel view of pH titration in biomolecules. *Biochemistry* **40**: 3413-3419.
- Padan, E., E. Bibi, M. Ito & T. A. Krulwich, (2005) Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta.* **1717**: 67-88.
- Peterson, G. L., (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.
- Popkin, P. S. & W. Maas, (1980) *Escherichia coli* regulatory mutation affecting lysine transport and lysine decarboxylase. *J. Bacteriol.* **141**: 485-492.
- Prosseda, G., M. Carmela Latella, M. Barbagallo, M. Nicoletti, R. Al Kassas, M. Casalino & B. Colonna, (2007) The two-faced role of *cad* genes in the virulence of pathogenic *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **158**: 487-493.

- Quick, M. & J. A. Javitch, (2007) Monitoring the function of membrane transport proteins in detergent-solubilized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 3603-3608.
- Quick, M., S. Tebbe & H. Jung, (1996) Ser57 in the Na⁺/proline permease of *Escherichia coli* is critical for high-affinity proline uptake. *Eur. J. Biochem.* **239**: 732-736.
- Ramos, S. & H. R. Kaback, (1977) The relation between the electrochemical proton gradient and active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Biochemistry* **16**: 854-859.
- Ramos, S., S. Schuldiner & H. R. Kaback, (1976) The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1892-1896.
- Rauschmeier, M., V. Schüppel, L. Tetsch & K. Jung, (2014) New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **426**: 215-229.
- Rhee, J. E., K.-S. Kim & S. H. Choi, (2005) CadC activates pH-dependent expression of the *Vibrio vulnificus cadBA* operon at a distance through direct binding to an upstream region. *J. Bacteriol.* **187**: 7870-7875.
- Richard, H. & J. W. Foster, (2004) *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol.* **186**: 6032-6041.
- Richard, H. T. & J. W. Foster, (2003) Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**: 167-186.
- Richet, E., A. L. Davidson & N. Joly, (2012) The ABC transporter MalFGK₂ sequesters the MalT transcription factor at the membrane in the absence of cognate substrate. *Mol. Microbiol.* **85**: 632-647.
- Rietkötter, E., D. Hoyer & T. Mascher, (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**: 768-785.
- Rigaud, J.-L., B. Pitard & D. Levy, (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1231**: 223-246.
- Rimon, A., Y. Gerchman, Y. Olami, S. Schuldiner & E. Padan, (1995) Replacements of histidine 226 of NhaA-Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. Cysteine (H226C) or serine (H226S) retain both normal activity and pH sensitivity, aspartate (H226D) shifts the pH profile toward basic pH, and alanine (H226A) inactivates the carrier at all pH values. *J. Biol. Chem.* **270**: 26813-26817.
- Rodionov, D. A., A. G. Vitreschak, A. A. Mironov & M. S. Gelfand, (2003) Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch? *Nucleic Acids Res.* **31**: 6748-6757.
- Roe, A. J., D. McLaggan, C. P. O'Byrne & I. R. Booth, (2000) Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K⁺ uptake system by high potassium concentrations. *Mol. Microbiol.* **35**: 1235-1243.

- Rosen, B. P., (1971) Basic amino acid transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **246**: 3653-3662.
- Rottenberg, H., (1976) The driving force for proton(s) metabolites cotransport in bacterial cells. *FEBS Lett.* **66**: 159-163.
- Rudnick, G., (2011) Cytoplasmic permeation pathway of neurotransmitter transporters. *Biochemistry* **50**: 7462-7475.
- Ruiz, J., I. Haneburger & K. Jung, (2011) Identification of ArgP and Lrp as transcriptional regulators of *lysP*, the gene encoding the specific lysine permease of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193**: 2536-2548.
- Russ, W. P. & D. M. Engelman, (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 863-868.
- Sabo, D. L., E. A. Boeker, B. Byers, H. Waron & E. H. Fischer, (1974) Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry* **13**: 662-670.
- Saier Jr, M. H., (2000) Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* **146**: 1775-1795.
- Saier, M. H., M. R. Yen, K. Noto, D. G. Tamang & C. Elkan, (2009) The transporter classification database: recent advances. *Nucleic Acids Res.* **37** D274-D278.
- Sal-Man, N., D. Gerber, I. Bloch & Y. Shai, (2007) Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J. Biol. Chem.* **282**: 19753-19761.
- Samartzidou, H. & A. H. Delcour, (1999) Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **181**: 791-798.
- Samartzidou, H., M. Mehrazin, Z. Xu, M. J. Benedik & A. H. Delcour, (2003) Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J. Bacteriol.* **185**: 13-19.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sansonetti, P. J., (2001) Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 3-14.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband & K. W. Eliceiri, (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**: 671-675.
- Schneider, D. & D. M. Engelman, (2003) GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J. Biol. Chem.* **278**: 3105-3111.

- Schulze, S., S. Köster, U. Geldmacher, A. C. T. van Scheltinga & W. Kühlbrandt, (2010) Structural basis of Na⁺-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature* **467**: 233-236.
- Schüppel, V. L. R., (2011) Identifizierung von Interaktionsstellen zwischen der Lysinpermease LysP und dem Transkriptionsaktivator CadC von *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Schweikhard, E. S. & C. M. Ziegler, (2012) Amino acid secondary transporters: toward a common transport mechanism. *Curr. Top. Membr.* **70**: 1-28.
- Schwöppe, C., H. H. Winkler & H. E. Neuhaus, (2003) Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1450-1457.
- Seufferheld, M. J., H. M. Alvarez & M. E. Farias, (2008) Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5867-5874.
- Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan & E. Gouaux, (2009) Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science* **325**: 1010-1014.
- Shi, L., M. Quick, Y. Zhao, H. Weinstein & J. A. Javitch, (2008) The mechanism of a neurotransmitter:sodium symporter-inward release of Na⁺ and substrate is triggered by substrate in a second binding site. *Mol. Cell* **30**: 667-677.
- Shi, L. & H. Weinstein, (2010) Conformational rearrangements to the intracellular open states of the LeuT and ApcT transporters are modulated by common mechanisms. *Biophys. J.* **99**: L103-L105.
- Shi, X., B. C. Waasdorp & G. N. Bennett, (1993) Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 1182-1186.
- Siebers, A. & K. Altendorf, (1988) The K⁺-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*. Purification, enzymatic properties and production of complex- and subunit-specific antisera. *Eur. J. Biochem.* **178**: 131-140.
- Slonczewski, J. L. & J. W. Foster, (1996) pH-regulated genes and survival at extreme pH. p. 1539-1549. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., *American Society for Microbiology, Washington, D. C.*
- Slonczewski, J. L., M. Fujisawa, M. Dopson & T. A. Krulwich, (2009) Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv. Microb. Physiol.* **55**: 1-79.
- Soksawatmaekhin, W., A. Kuraishi, K. Sakata, K. Kashiwagi & K. Igarashi, (2004) Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1401-1412.

- Soksawatmaekhin, W., T. Uemura, N. Fukiwake, K. Kashiwagi & K. Igarashi, (2006) Identification of the cadaverine recognition site on the cadaverine-lysine antiporter CadB. *J. Biol. Chem.* **281**: 29213-29220.
- Staroń, A., D. E. Finkeisen & T. Mascher, (2011) Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **55**: 515-525.
- Steffes, C., J. Ellis, J. Wu & B. P. Rosen, (1992) The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J. Bacteriol.* **174**: 3242-3249.
- Stim-Herndon, K. P., T. M. Flores & G. N. Bennett, (1996) Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (*adiA*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**: 1311-1320.
- Stim, K. P. & G. N. Bennett, (1993) Nucleotide sequence of the *adi* gene, which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 1221-1234.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt, (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Sun, L., T. Fukamachi, H. Saito & H. Kobayashi, (2005) Carbon dioxide increases acid resistance in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**: 397-400.
- Tabor, H., E. Hafner & C. Tabor, (1980) Construction of an *Escherichia coli* strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. *J. Bacteriol.* **144**: 952-956.
- Tabor, S. & C. C. Richardson, (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.
- Takayama, M., T. Ohyama, K. Igarashi & H. Kobayashi, (2006) *Escherichia coli cad* operon functions as a supplier of carbon dioxide. *Mol. Microbiol.* **11**: 913-918.
- Tao, K., N. Fujita & A. Ishihama, (1993) Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. *Mol. Microbiol.* **7**: 859-864.
- Tao, K., C. Zou, N. Fujita & A. Ishihama, (1995) Mapping of the OxyR protein contact site in the C-terminal region of RNA polymerase alpha subunit. *J. Bacteriol.* **177**: 6740-6744.
- Tetsch, L. & K. Jung, (2009a) How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? Transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids* **37**: 467-477.
- Tetsch, L. & K. Jung, (2009b) The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol. Microbiol.* **73**: 982-991.
- Tetsch, L., C. Koller, A. Dönhöfer & K. Jung, (2011) Detection and function of an intramolecular disulfide bond in the pH-responsive CadC of *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **11**: 74.

- Tetsch, L., C. Koller, I. Haneburger & K. Jung, (2008) The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol. Microbiol.* **67**: 570-583.
- Thevelein, J. M. & K. Voordeckers, (2009) Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2407-2414.
- Thomason, L. C. & N. Costantino, (2007) *Escherichia coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*: Chapter 1: Unit 1.17.
- Tomitori, H., K. Kashiwagi & K. Igarashi, (2012) Structure and function of polyamine-amino acid antiporters CadB and PotE in *Escherichia coli*. *Amino Acids* **42**: 733-740.
- Ude, S., J. Lassak, A. L. Starosta, T. Kraxenberger, D. N. Wilson & K. Jung, (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* **339**: 82-85.
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin & I. B. Zhulin, (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**: 52-56.
- Van Zeebroeck, G., B. M. Bonini, M. Versele & J. M. Thevelein, (2008) Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transceptor. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 45-52.
- Veenhoff, L. M., E. H. M. L. Heuberger & B. Poolman, (2002) Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 242-249.
- Veldhuis, G., E. P. Vos, J. Broos, B. Poolman & R. M. Scheek, (2004) Evaluation of the flow-dialysis technique for analysis of protein-ligand interactions: an experimental and a monte carlo study. *Biophys. J.* **86**: 1959-1968.
- Viklund, H. & A. Elofsson, (2004) Best α -helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein Sci.* **13**: 1908-1917.
- Viklund, H. & A. Elofsson, (2008) OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* **24**: 1662-1668.
- Watson, N., D. Dunyak, E. Rosey, J. Slonczewski & E. Olson, (1992) Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli* cad operon by external pH. *J. Bacteriol.* **174**: 530-540.
- Weckerlein, B., (2010) Charakterisierung der Lysinpermease LysP in *Escherichia coli* hinsichtlich Lysintransport und Regulation. *Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Wieland, M. J., (2013) Charakterisierung von Orthologen der Lysin-spezifischen Permease LysP in *Escherichia coli* hinsichtlich Regulation und Transport. *Bachelorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München*.

- Wilks, J. C. & J. L. Slonczewski, (2007) pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* **189**: 5601-5607.
- Witan, J., J. Bauer, I. Wittig, P. A. Steinmetz, W. Erker & G. Unden, (2012a) Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol. Microbiol.* **85**: 846-861.
- Witan, J., C. Monzel, P. D. Scheu & G. Unden, (2012b) The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biol. Chem.* **393**: 1291-1297.
- Wong, F. H., J. S. Chen, V. Reddy, J. L. Day, M. A. Shlykov, S. T. Wakabayashi & M. H. Saier Jr, (2012) The amino acid-polyamine-organocation superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 105-113.
- Wortham, B. W., M. A. Oliveira & C. N. Patel, (2007) Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**: 106-115.
- Wu, B., K. Ottow, P. Poulsen, R. F. Gaber, E. Albers & M. C. Kielland-Brandt, (2006) Competitive intra- and extracellular nutrient sensing by the transporter homologue Ssy1p. *J. Cell Biol.* **173**: 327-331.
- Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin & E. Gouaux, (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **437**: 215-223.
- Zheng, M., F. Åslund & G. Storz, (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1722.
- Zimmer, D. P., E. Soupene, H. L. Lee, V. F. Wendisch, A. B. Khodursky, B. J. Peter, R. A. Bender & S. Kustu, (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 14674-14679.
- Zomot, E. & I. Bahar, (2011) Protonation of glutamate 208 induces the release of agmatine in an outward-facing conformation of an arginine/agmatine antiporter. *J. Biol. Chem.* **286**: 19693-19701.

Anhang

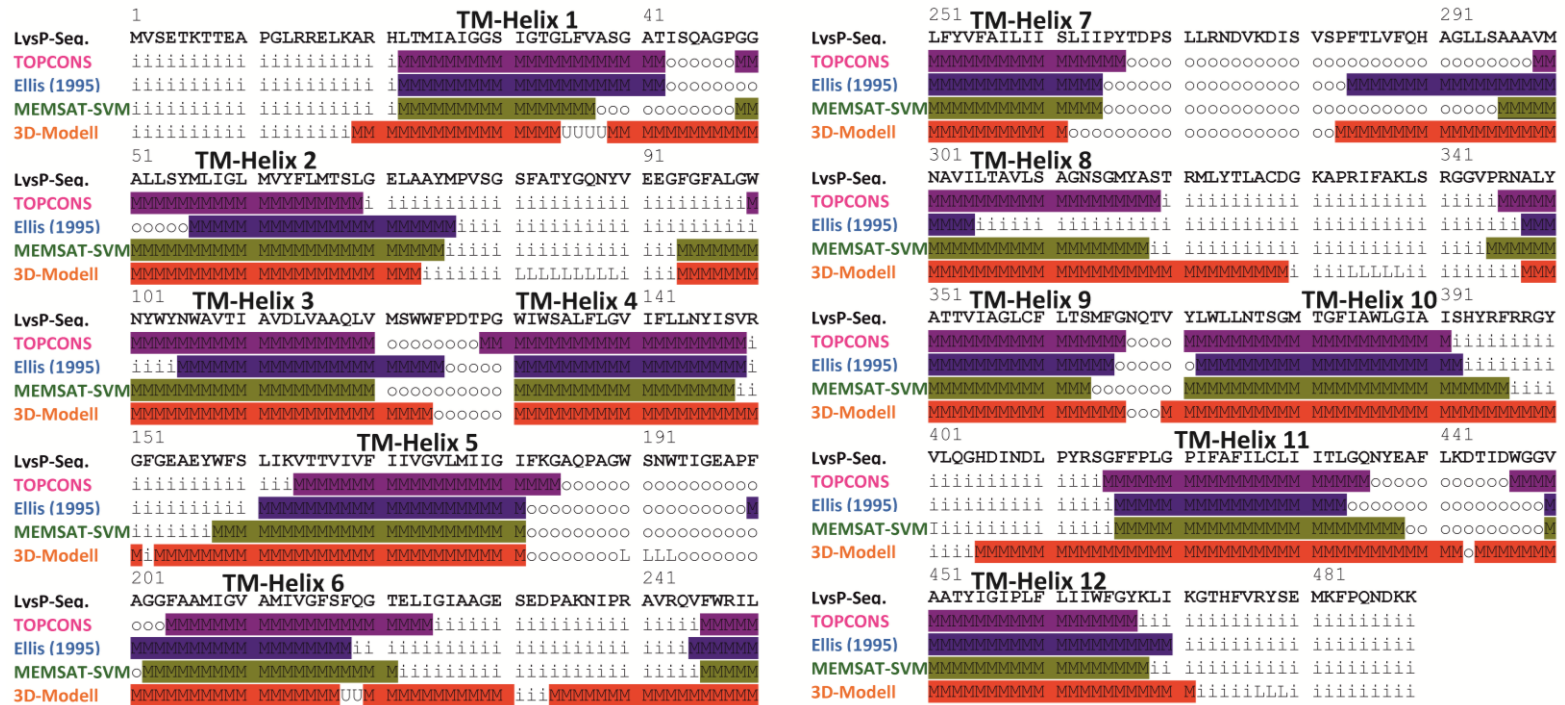


Abb. A1: Vergleich der experimentell ermittelten LysP-Topologie [(Ellis *et al.*, 1995), violette Topologie] mit computergestützten in silico Vorhersagen der LysP-Sekundärstruktur und dem 3D-Homologiemodell von LysP. Die putative TM-Domänen-Topologie wurde mit Hilfe von fünf unterschiedlichen Algorithmen vorhergesagt: SCAMPI-seq (Bernsel *et al.*, 2008), SCAMPI-msa (Bernsel *et al.*, 2008), PRODIV (Viklund & Elofsson, 2004), PRO (Viklund & Elofsson, 2004) und OCTOPUS (Viklund & Elofsson, 2008). Das Programm TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009) integrierte alle vorausgesagten Topologien und generierte eine Konsens-Vorhersage für LysP (magenta Topologie). Die Funktion der TM-Helices 1, 2, 3, 6 und 8 als Transportporenbildner wurden mit MEMSAT-SVM (Nugent & Jones, 2012) vorhergesagt (grüne Topologie). Das LysP-3D-Homologiemodell basiert auf der Kristallstruktur von ApcT von *M. jannaschii* und wurde mittels dem PHYRE²-Server generiert [(Kelley & Sternberg, 2009), orange Topologie]. Die TM-Helices sind mit von 1 bis 12 nummeriert. M mit korrespondierender Farbhinterlegung, putative α -helikale Membrandomäne; i, (engl. inside) zytoplasmatisch lokalisierter Proteinanteil; o, (engl. outside) periplasmatisch lokalisierter Proteinanteil; L, (engl. loop) zytoplasmatischer bzw. periplasmatischer α -helikaler Bereich; U, (engl. unwound) ungewundenes transmembranes Segment.

155

Danksagung

Bei Fr. Prof. Dr. Kirsten Jung möchte ich mich besonders für die Möglichkeit bedanken, in ihrer exzellenten Arbeitsgruppe, eingebettet in einem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld, promovieren zu dürfen. Außerdem möchte ich mich für die spannende Themenstellung (Analyse eines prokaryotischen Trigger-Transporters) bedanken, die mich seit meiner universitären Ausbildung sehr fasziniert. Basierend auf ihrer steten Diskussions- und Hilfsbereitschaft konnten Teile der vorliegenden Arbeit erfolgreich publiziert werden.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Hr. Prof. Dr. Thorsten Mascher für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens für diese Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank der Universität Bayern e. V., deren Gewährung eines Stipendiums nach dem Bayerischen Elitförderungsgesetz und der Finanzierung von Tagungsbesuchen die finanzielle Basis meiner Promotion bildete.

Ebenfalls möchte ich mich beim Exzellenzcluster CIPSM (Center of Integrated Protein Science Munich) für Zuschüsse bei der Anschaffung von Verbrauchsmaterialien herzlich bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. Larissa Tetsch und an meine ehemaligen Diplomstudenten Bärbel Weckerlein und Valentina Schüppel für die kooperative Konstruktion von etlichen LysP-Varianten. Vielen Dank auch an meine ehemaligen Bachelor-Studenten Elisabeth Krause und Maximiliane Wieland für die gemeinsame Laborzeit.

Vielen vielen Dank an Fr. Buchner, Fr. Dr. Ude und Hr. Behr! Ihr wart mein Zufluchtsbüro!

Bei Hr. Prof. Dr. Heinrich Jung, PD Dr. Ralf Heermann, Dr. Frank Landgraf, Dr. Jürgen Lassak, Dr. Laure Plener, Dr. Jimena Ruiz, Dr. Tobi Kraxenberger, Dr. Ina Haneburger, Dr. Claudia Anetzberger, Dr. Poldi Fried, Dr. Daniel Hilger, Dr. Michi Raba, Dr. Ara Rivera, Günther Gabriel, Katja Zigann, Sophie Brameyer, Angela Glaeser, Hannah Schramke, Yang Wang, Sabine Scheu, Tobias Bauer, Matthias Reiger, Nicola Lorenz, Elaine Marie Rabener, Susi Bracher, Becker Felix, Michelle Eder und Birgit Isele bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima. Ein großes Dankeschön an Korinna Burdack für die Konstruktion von im Rahmen dieser Arbeit benötigten *E. coli* Stämmen und Ingrid Weitzl für zahlreiche Membranpräparationen.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern Barbara und Franz Rauschmeier, auf deren bedingungslose Unterstützung und moralischen Beistand ich während meines Promotionsstudiums jederzeit vertrauen konnte. Leider kannst du mein geliebter Papa die finale Phase meiner Promotion nicht mehr miterleben, aber ich weiß, dass du sehr stolz auf mich bist. Ich möchte mich bei meiner geliebten Schwester und Freundin Verena Rauschmeier für ihre aufbauende und energische moralische Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Ein großer Dank gebührt auch meinem Lieblingsbruder Andreas Rauschmeier - ohne Dich wäre mein Leben entschieden zu gelassen! Ihr wart und seid stets der größte Halt in meinem Leben!

Zu guter Letzt: Vielen Dank Elko, Cora, Wolke, Lia, Lady und Cassy!